(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-527483
(P2016-527483A)
(43)公表日　平成28年9月8日(2016.9.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/574	***(2006.01)***	G01N	33/574	A	2G045
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/574	ZNAZ	4B063
G01N 33/50	***(2006.01)***	G01N	33/53	D	4H045
C07K 16/18	***(2006.01)***	G01N	33/53	M	
C12Q 1/68	***(2006.01)***	G01N	33/50	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 97 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-518800 (P2016-518800)
(86)(22)出願日　平成26年6月13日 (2014.6.13)
(85)翻訳文提出日　平成28年2月9日 (2016.2.9)
(86)国際出願番号　PCT/AU2014/000612
(87)国際公開番号　WO2014/197937
(87)国際公開日　平成26年12月18日 (2014.12.18)
(31)優先権主張番号　2013902141
(32)優先日　平成25年6月13日 (2013.6.13)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　501345909
ユニバーシティ　オブ　サウス　オーストラリア
Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｓｏｕｔｈ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ
オーストラリア国　５０００　サウスオーストラリア州　アデレード　ノース　テラス
(74)代理人　100106002
弁理士　正林　真之
(74)代理人　100120891
弁理士　林　一好
(74)代理人　100165157
弁理士　芝　哲央

最終頁に続く

(54)【発明の名称】前立腺癌を検出する方法

(57)【要約】
本開示は、前立腺癌を検出する方法に関する。本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出し、それによって前記対象における前立腺癌を検出するステップを含む方法。
【請求項２】
前記選択されたマーカーが、初期エンドソームマーカー、後期エンドソームマーカー、エンドソーム生合成に関連するマーカー、エンドソーム輸送に関連するマーカー、及びエンドソーム再利用に関連するマーカーの１種以上を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記選択されたマーカーが、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記選択されたマーカーの存在の変化、レベルの変化、分泌の変化及び分布の変化のうち１つ以上が前記対象における前立腺癌を示す、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
ＲＡＢ５タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ５タンパク質の分泌の増加、ＡＰＰＬ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＡＰＰＬ１タンパク質の分泌の増加、ＥＥＡ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＥＥＡ１タンパク質の分泌の増加、ＬＩＭＰ－２タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＴＦＲ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＴＦＲ２タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ４タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ４タンパク質の分泌の増加、ＡＰＰＬ２タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＬＡＭＰ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＲＡＢ１１タンパク質の分泌の増加、ＲＡＢ７タンパク質の分泌の減少、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、カテプシンＤタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、αガラクトシダーゼタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＳＴＸ７タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＳＴＸ１２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質の分泌の増加、ＳＤＣＢＰタンパク質の分泌の減少、ＳＯＲＴ１タンパク質の分泌の減少、ＦＧＦ１タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦ３タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＦＧＦＲ１タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦＲ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦＲ３タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＮＯＸ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、及びＮＯＸ４タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＡＰＰＬ１タンパク質の核及び／又は核小体レベルの増加、ＲＡＢ７タンパク質の核膜レベルの増加、並びにＬＩＭＰ２タンパク質陽性小胞の増大のうち１つ以上が、前記対象における前立腺癌を示す、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
存在の変化、レベルの変化、発現の変化、分泌の変化及び分布の変化が、非悪性組織、前立腺上皮内腫よう、原発性前立腺癌及び転移性前立腺癌の１種以上と比較される、請求項４又は５に記載の方法。
【請求項７】
ＬＩＭＰ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺より

も増加する、ＬＡＭＰ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも減少する、ＬＡＭＰ１タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも減少する、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも増加する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、ＡＰＰＬ１タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、ＲＡＢ５タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＥＥＡ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＥＥＡ１タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて原発性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも減少する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも減少する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも減少する、ＳＤＣＢＰタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＳＴＸ７タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＦＧＦＲ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも増加する、ＦＧＦＲ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも減少する、ＮＯＸ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、及びＮＯＸ４タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも増加する、請求項６に記載の方法。

【請求項８】

前記方法が、生物試料を前記対象から得るステップ、及び前記生物試料を加工して、前記選択されたマーカーの検出を可能にするステップを含む、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

前記生物試料が、血液試料、血しょう試料、血清試料、生検試料及び前立腺組織試料の１つ以上を含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記選択されたマーカーを検出するステップがポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項１から９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】

前記選択されたマーカーを検出するステップが免疫学的検出を含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

前記方法が、２種以上の選択されたマーカーを検出するステップを含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】
前記方法が、１種の選択されたマーカーと別の選択されたマーカーのレベルの比を求めるステップを含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
非悪性組織に比べた比の変化が前記対象における前立腺癌を示す、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
非悪性組織に比べた初期エンドソームマーカーと後期エンドソームマーカーの比の増加が、前記対象における前立腺癌を示す、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記方法が、前記選択されたマーカーの存在及び／又はレベルを、前記対象における前立腺癌のリスクの変化に関連する１種以上の別のマーカー及び／又は前立腺癌の有無を示すことが知られている１種以上の別のマーカーの存在及び／又はレベルと比較するステップを含む、請求項１から１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記１種以上の別のマーカーが前立腺特異抗原を含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記方法が、さらに、前記対象の１つ以上の臨床特徴に関する情報を得るステップと、前記情報を前記選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上と組み合わせて使用して、前記対象における前立腺癌を検出するステップとを含む、請求項１から１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記方法が、前記選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上並びに場合によっては１つ以上の臨床特徴に関連したデータを処理するコンピュータプロセッサ手段を使用して、前記対象における前立腺癌の存在の尤度及び／又はリスクを生成するステップを含む、請求項１から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記前立腺癌が、前立腺上皮内腫よう、原発性前立腺癌及び転移性前立腺癌から選択される、請求項１から１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記方法を使用して、前記対象における前立腺癌を診断する、前記対象における前立腺癌をスクリーニングする、予後を評価する、前立腺癌の転移能を求める、前立腺癌に罹患した対象を特定する、前立腺癌を発症しやすい対象を特定する、前記対象における前立腺癌の再発率を求める、前記対象における前立腺癌による死亡リスクを求める、前記前立腺癌を層別化する、前記対象における前立腺癌と前立腺癌ではないことを識別する、前記前立腺癌が臓器限局性癌であるかどうかを判定する、前立腺癌と良性前立腺肥大症、前立腺炎及び前立腺炎症性症状の１つ以上を識別する、病原の悪化を判定する、前記前立腺癌が、増殖を遅らせているかどうか、無痛性であるかどうか、又は侵襲性であるかどうか評価する、前記対象における前立腺癌の存在を排除する、前立腺癌の治療及び／又は手術が適切な対象を特定する、並びに対象が前立腺癌を有する尤度又はリスクを求める、請求項１から２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
対象における前立腺癌を検出する方法であって、
生物試料を前記対象から得るステップ、
前記試料を加工して、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーの検出を可能にするステップ、
前記加工試料における前記選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の変化の１つ以上を検出するステップ、並びに
前記対象における前立腺癌を特定するステップ
を含む方法。

【請求項２３】
対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップを含む方法。
【請求項２４】
前記方法を使用して、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記方法を使用して、前立腺癌に罹患していない対象、又は前立腺癌を発症しにくい対象を除外する、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップを含む方法。
【請求項２７】
対象における前立腺癌を検出するための診断方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップを含む方法。
【請求項２８】
対象が前立腺癌に罹患する、又は前立腺癌を発症しやすい尤度及び／又はリスクを求める方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップを含む方法。
【請求項２９】
対象における前立腺癌の進行を判定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップを含む方法。
【請求項３０】
前記方法が、前記癌の生化学的再発、再発率、及び／又は生存率を求めるステップを含む、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記マーカーのレベルが、再発率の減少、及び／又は生存率の増加を示す、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記マーカーが、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ７Ａ、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
前記マーカーが、減少した若しくはより低いＬＩＭＰ２、増加した若しくはより高いカテプシンＢ、増加した若しくはより高いカテプシンＤ、増加した若しくはより高いαガラクトシダーゼ、減少した若しくはより低いＲＡＢ５Ａ、減少した若しくはより低いＥＥＡ１、増加した若しくはより高いＲＡＢ７Ａ、増加した若しくはより高いＭ６ＰＲ、減少した若しくはより低いＩＧＦＲ２、減少した若しくはより低いＳＯＲＴ１、減少した若しくはより低いＭＹＯ１Ｂ、増加した若しくはより高いＰＤＣＤ６ＩＰ、増加した若しくはより高いＳＴＸ１２、増加した若しくはより高いＦＧＦ２、増加した若しくはより高いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】

前記方法が、さらに、前記対象におけるＰＳＡ発現レベルを確認するステップ、及び前記対象における前記ＰＳＡ発現レベルに基づいて前記マーカーの発現を層別化するステップを含む、請求項２９から３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

前記ＰＳＡが、低リスクの前立腺癌を示すレベルである、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

前記ＰＳＡレベルが１０ｎｇ／ｍｌ未満である、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記ＰＳＡが７．８ｎｇ／ｍｌ以下のレベルである、請求項３５又は３６に記載の方法。

【請求項３８】

前記マーカーが、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む、請求項３５から２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記マーカーが、減少した若しくはより低いＬＩＭＰ２、増加した若しくはより高いカテプシンＢ、増加した若しくはより高いαガラクトシダーゼ、減少した若しくはより低いＲＡＢ５Ａ、減少した若しくはより低いＥＥＡ１、増加した若しくはより高いＭ６ＰＲ、減少した若しくはより低いＩＧＦＲ２、減少した若しくはより低いＳＯＲＴ１、減少した若しくはより低いＭＹＯ１Ｂ、増加した若しくはより高いＰＤＣＤ６ＩＰ、増加した若しくはより高いＳＤＣ１、増加した若しくはより高いＳＴＸ１２、増加した若しくはより高いＦＧＦ２、増加した若しくはより高いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

前記マーカーのレベルが、再発率の増加、及び／又は生存率の低下を示す、請求項３０に記載の方法。

【請求項４１】

前記マーカーが、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ７Ａ、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

前記マーカーが、増加した若しくはより高いＬＩＭＰ２、減少した若しくはより低いカテプシンＢ、減少した若しくはより低いカテプシンＤ、減少した若しくはより低いαガラクトシダーゼ、増加した若しくはより高いＲＡＢ５Ａ、増加した若しくはより高いＥＥＡ１、減少した若しくはより低いＲＡＢ７Ａ、減少した若しくはより低いＭ６ＰＲ、増加した若しくはより高いＩＧＦＲ２、増加した若しくはより高いＳＯＲＴ１、増加した若しくはより高いＭＹＯ１Ｂ、減少した若しくはより低いＰＤＣＤ６ＩＰ、減少した若しくはより低いＳＴＸ１２、減少した若しくはより低いＦＧＦ２、減少した若しくはより低いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む、請求項４０に記載の方法。

【請求項４３】

前記方法が、さらに、前記対象におけるＰＳＡ発現レベルを確認するステップ、及び前記対象における前記ＰＳＡ発現レベルに基づいて前記マーカーの発現を層別化するステップを含む、請求項４０から４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４４】
前記ＰＳＡが、低リスクの前立腺癌を示すレベルである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＰＳＡレベルが１０ｎｇ／ｍｌ未満である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記ＰＳＡが７．８ｎｇ／ｍｌ以下のレベルである、請求項４４又は４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記マーカーが、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む、請求項４４から４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記マーカーが、増加した若しくはより高いＬＩＭＰ２、減少した若しくはより低いカテプシンＢ、減少した若しくはより低いαガラクトシダーゼ、増加した若しくはより高いＲＡＢ５Ａ、増加した若しくはより高いＥＥＡ１、減少した若しくはより低いＭ６ＰＲ、増加した若しくはより高いＩＧＦＲ２、増加した若しくはより高いＳＯＲＴ１、増加した若しくはより高いＭＹＯ１Ｂ、減少した若しくはより低いＰＤＣＤ６ＩＰ、減少した若しくはより低いＳＤＣ１、減少した若しくはより低いＳＴＸ１２、減少した若しくはより低いＦＧＦ２、減少した若しくはより低いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
請求項１から４８のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。
【請求項５０】
対象における前立腺癌を治療する方法であって、
エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを前記対象から検出するステップ、並びに
検出された前記選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に基づいて前記対象を治療するステップ
を含む方法。
【請求項５１】
ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離又は精製抗体。
【請求項５２】
ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上を含むヒトＡＰＰＬ１タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体。
【請求項５３】
ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣ

ＳＣ（配列番号６）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離及び／又は精製抗体。

【請求項５４】

ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）の１つ以上を含むヒトＲＡＢ７タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体。

【請求項５５】

ＡＰＰＬ１タンパク質又はその断片を検出する方法であって、請求項５１又は５２に記載の抗体を使用して前記ＡＰＰＬ１タンパク質又はその断片を検出するステップを含む方法。

【請求項５６】

ＲＡＢ７タンパク質又はその断片を検出する方法であって、請求項５３又は５４に記載の抗体を使用して前記ＲＡＢ７タンパク質又はその断片を検出するステップを含む方法。

【請求項５７】

対象における前立腺癌を検出する方法であって、請求項５１から５４のいずれか一項に記載の抗体を使用して、ＡＰＰＬ１若しくはＲＡＢ７タンパク質、及び／又はその断片、誘導体若しくは加工体を前記対象から検出するステップを含む方法。

【請求項５８】

前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーを特定する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを特定するステップ、並びに

前立腺癌を診断及び／又は予知する前記選択されたマーカーの能力を判定するステップを含み、

それによって前記マーカーを前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーであると確認する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

優先権の主張

本願は、その内容を参照により本明細書に援用する２０１３年６月１３日に出願されたオーストラリア仮特許出願第２０１３９０２１４１号の優先権を主張するものである。

【０００２】

本発明は、前立腺癌を検出する方法、前立腺癌の診断及び／又は予知のための方法、前立腺癌の進行を確認する方法、マーカーの検出に基づいて前立腺癌を治療する方法、並びに前立腺癌の診断及び／又は予知に有用である抗体に関する。

【背景技術】

【０００３】

前立腺癌は、先進国の男性において最も一般的な癌の形態であり、この疾患の発生率は、２０３０年までに全世界で２倍になると予測されている。例えば、２００８年には、二万人を超えるオーストラリア人男性が前立腺癌と診断され、約三千人が亡くなり、この疾患が癌関連死の最大原因の１つになった。

【０００４】

現在、前立腺特異抗原（ＰＳＡ：ｐｒｏｓｔａｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ）試験が前立腺癌検診に用いられているが、この試験法は、偽陽性結果の割合が高いことを含めて、幾つかの欠点がある。ＰＳＡは、診断時に侵襲性の癌とそれよりも進行の遅い癌を区別することもできず、過剰処置を生じている。最近、特に高齢男性においては、

この手順を放棄することが推奨されている。
【０００５】
デジタル直腸検査は、前立腺の異常を調べる別の手順であるが、この試験は、腺全体を診断することができず、腫ようサイズがある程度限定される。
【０００６】
したがって、早期診断を助け、最も適切な治療的介入の選択を助ける、より特異的及び／又はより正確な前立腺癌検出方法が早急に求められる。早期検出は、前立腺癌死亡率をかなり低下させ、診断及び予知の方法の改善を重要な目標とする。
【０００７】
前立腺癌の診断及び／又は予知の現行技術に欠けているものを考えれば、前立腺癌の検出に役立つ別のバイオマーカーを利用できることが極めて有利であろう。しかし、前立腺癌に関連した臨床的に意義のあるバイオマーカーの特定が問題として残る。
【０００８】
したがって、前立腺癌を検出するための別のバイオマーカー、及び／又は当該技術分野において１つ以上の利点を提供する別のバイオマーカーを特定する必要がある。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本開示は、特異的エンドソーム及び／又はリソソーム関連マーカーを対象における前立腺癌の検出に使用できるという結論に基づく。
【００１０】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出し、それによって対象における前立腺癌を検出するステップを含む方法を提供する。
【００１１】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【００１２】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含み、選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の変化のうち１つ以上の変化が、対象における前立腺癌を示す方法を提供する。
【００１３】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、
生物試料を対象から得るステップ、
試料を加工して、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーの検出を可能にするステップ、
加工試料における選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の変化の１つ以上を検出するステップ、並びに
対象における前立腺癌を特定するステップを含む方法を提供する。
【００１４】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、
生物試料を対象から得るステップ、
試料を加工して、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーの検出を可能にするステップ、
加工試料における選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上を検出するステップ、
選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上を、対象における前立腺癌の有無を示すことが知られている１種以上の別のマーカーと比較するステップ、並びに

対象における前立腺癌を特定するステップを含む方法を提供する。

【００１５】

本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００１６】

本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含み、選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の変化のうち１つ以上の変化が、対象が前立腺癌に罹患した、又は前立腺癌を発症しやすいことを示す方法を提供する。

【００１７】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００１８】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含み、選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の変化のうち１つ以上の変化が、対象における前立腺癌を示す方法を提供する。

【００１９】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を治療する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップ、並びに

検出された選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に基づいて対象を治療するステップを含む方法を提供する。

【００２０】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出するための診断方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００２１】

本開示のある実施形態は、対象が前立腺癌に罹患する、又は前立腺癌を発症しやすい尤度及び／又はリスクを求める方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００２２】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の進行を判定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００２３】

本開示のある実施形態は、本明細書に記載の方法を実施するキットを提供する。

【００２４】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を治療する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップ、並びに

検出された選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に基づいて対象を治療するステップを含む方法を提供する。

【００２５】

本開示のある実施形態は、ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴ

ＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離又は精製抗体を提供する。

【００２６】

本開示のある実施形態は、ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上を含むヒトＡＰＰＬ１タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体を提供する。

【００２７】

本開示のある実施形態は、ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離及び／又は精製抗体を提供する。

【００２８】

本開示のある実施形態は、ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）の１つ以上を含むヒトＲＡＢ７タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体を提供する。

【００２９】

本開示のある実施形態は、ＡＰＰＬ１タンパク質又はその断片を検出する方法であって、本明細書に記載のＡＰＰＬ１抗体を使用するステップを含む方法を提供する。

【００３０】

本開示のある実施形態は、ＲＡＢ７タンパク質又はその断片を検出する方法であって、本明細書に記載のＲＡＢ７抗体を使用するステップを含む方法を提供する。

【００３１】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、本明細書に記載のＡＰＰＬ１抗体及び／又はＲＡＢ７抗体を使用するステップを含む方法を提供する。

【００３２】

本開示のある実施形態は、前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーを特定する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを特定するステップ、並びに

前立腺癌を診断及び／又は予知する選択されたマーカーの能力を判定するステップを含み、

それによってマーカーを前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーであると確認する方法を提供する。

【００３３】

他の実施形態も本明細書に開示する。

【００３４】

幾つかの実施形態を以下の図によって説明する。以下の記述は、特定の実施形態を記述するためのものにすぎず、その記述に関して限定的であることを意図するものではないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１】コントロール及び前立腺癌細胞株におけるエンドソーム及びリソソーム遺伝子発現の定量化を示す図である。非悪性コントロール細胞株（白棒）及び前立腺癌細胞株（黒棒）におけるｍＲＮＡ転写物のレベルを３つ組実験のｑＰＣＲによって評価した。データをＧＡＰＤＨ内在性コントロールに対して相対的に表し、クラスカル　ワリス順位和法によって解析した。統計的有意性（ｐ＜０．０５）をアステリスクで示す。
【図２】非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株における細胞内リソソームタンパク質の検出及び定量化を示す図である。（Ａ）３つ組で検査した非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ由来の全細胞溶解物１０μｇのウエスタンブロット分析の代表的画像。（Ｂ）タンパク質量を濃度測定によってＧＡＰＤＨ内在性コントロールに対して相対的に定量化した。データをクラスカル　ワリス順位和法によって解析した。統計的有意性（ｐ＜０．０５）をアステリスクで示した。
【図３】前立腺癌細胞株におけるエンドソームマーカーの局在が非悪性コントロール細胞株に比べて変化したことを示す共焦点顕微鏡写真である。固定細胞のエンドソームマーカー（緑）を探索し、ＤＡＰＩ核染色（青）で対比染色し、レーザー走査型共焦点顕微鏡法によって可視化した。細胞輪郭（白色）を可視化するために透過光照明を捕らえた。スケールバーはすべての画像で１０μｍである。
【図４】前立腺細胞株におけるＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ（登録商標）陽性小胞の共焦点顕微鏡写真である。非悪性コントロール前立腺細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰをＬｙｓｏｔｒａｃｋｅｒ（登録商標）（緑）で染色した。細胞輪郭をＴＰＭＴで可視化し、膜を白色点線（ｂｏｔｔｅｄ　ｌｉｎｅ）で示した。スケールバーはすべての画像で１０μｍである。
【図５】前立腺細胞株におけるトランスフェリン取り込みの時間経過を示す図である。アクチン染色の変化と一緒に、非悪性コントロール細胞株に比べた前立腺癌細胞株におけるトランスフェリンの取り込みの増加及び分布の変化を示す共焦点顕微鏡写真。細胞培養物を、細胞固定前に５、１５及び３０分間トランスフェリンＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３複合物（赤）と一緒にインキュベートし、ファロイジンＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８（緑）で標識したアクチンと一緒にインキュベートした。スケールバーは１０μｍである。
【図６】トランスフェリン及びエンドソーム／リソソームマーカー共蛍光（ｃｏ－ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ）を示す図である。非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰにおけるトランスフェリン（赤）及びエンドソーム／リソソームマーカー（緑）を示す共焦点顕微鏡写真。共存は、黄色の蛍光で示される。
【図７】トランスフェリン受容体発現の分析及びトランスフェリンの細胞局在化を示す図である。（Ａ）トランスフェリン受容体１（ＴＦＲ１：ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　１）及びトランスフェリン受容体２（ＴＦＲ２：ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　２）のタンパク質量及び遺伝子発現のウエスタンブロット分析及び定量化。タンパク質及び遺伝子発現の定量化は、それぞれＧＡＰＤＨタンパク質及び遺伝子に対する相対的なものである。アステリスクはｐ＜０．０５を表す。（Ｂ）非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰにおけるトランスフェリン（赤）及びトランスフェリン受容体（緑）を示す共焦点顕微鏡写真及び拡大写真。トランスフェリン受容体とトランスフェリンの共存は、黄色の蛍光で示される。
【図８】トランスフェリン処理前後の非悪性コントロール及び癌細胞株におけるＡＫＴリン酸化レベルを示す図である。
【図９】異なる症例から単離された前立腺組織におけるＬＡＭＰ－１及びＡＰＰＬ１発現を示す図である。対応ヒト非悪性（Ａ，Ｄ）前立腺組織と腫よう（Ｂ，Ｅ）前立腺組織におけるＬＡＭＰ－１及びＡＰＰＬ１の発現。非悪性組織と悪性組織のどちらもＬＡＭＰ－

１（Ｃ）及びＡＰＰＬ１（Ｆ）について染色される。Ｄ及びＦの矢印は、非悪性前立腺組織における基底膜を染色するＡＰＰＬ１を示す。スケールバー＝Ａ、Ｂ＆Ｄは１００μＭ、Ｃ、Ｅ、Ｆは２００μＭ。

【図１０】非悪性及び前立腺癌細胞株における公知の前立腺癌バイオマーカーの検出及び定量化を示す図である。非悪性コントロール細胞株ＲＷＰＥ１、ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１、ＣａＨＰＶ１０、ＤＵ１４５及びＬＮＣａＰ由来の細胞抽出物（Ａ；全細胞溶解物５０μｇ）及び培地（Ｂ；細胞がコンフルエントになった４８時間のインキュベーション後に収集された培地３ｍＬ）におけるバイオマーカー／ＧＡＰＤＨのウエスタンブロット。ウエスタンブロットは、３つ組のうちの代表である。各細胞内（Ｃ）又は分泌（Ｄ）タンパク質の量をウエスタンブロットから濃度測定によってＧＡＰＤＨ（内在性コントロール）に対して相対的に定量化した。非悪性細胞株を白棒で示し、前立腺癌細胞株を黒棒で示す。結果を平均±ＳＥ（ｎ＝３）で表す。

【図１１】非悪性及び前立腺癌細胞株におけるリソソームタンパク質の検出を示す図である。非悪性コントロール細胞株ＲＷＰＥ１、ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１、ＣａＨＰＶ１０、ＤＵ１４５及びＬＮＣａＰ由来の細胞抽出物（Ａ；全細胞溶解物５０μｇ）及び培地（Ｂ；細胞がコンフルエントになった４８時間のインキュベーション後に収集された培地３ｍＬ）におけるリソソームタンパク質／ＧＡＰＤＨのウエスタンブロット。ウエスタンブロットは、３つ組実験のうちの代表である。

【図１２】非悪性及び前立腺癌細胞株におけるリソソームタンパク質の定量化を示す図である。各細胞内（Ａ）又は分泌（Ｂ）リソソームタンパク質の量をウエスタンブロット（図１２．２）から濃度測定によってＧＡＰＤＨ（内在性コントロール）に対して相対的に定量化した。非悪性細胞株を白棒で示し、前立腺癌細胞株を黒棒で示す。結果を平均±ＳＥ（ｎ＝３）で表す。

【図１３】ＬＩＭＰ２及びＬＡＭＰ１遺伝子発現が前立腺癌においてＴＦＥＢ発現とは無関係に変化することを示す図である。１５０個の原発性前立腺癌及び２９個の非悪性組織のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｈｕｍａｎ　Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイ由来の発現プロファイリングデータ｛テイラー（Ｔａｙｌｏｒ）、２０１０＃９７６｝を定量して、ＴＦＥＢ、ＬＩＭＰ２及びＬＡＭＰ１の遺伝子発現率変化を示した。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。

【図１４】前立腺癌における発現が変わりやすい、ＴＦＥＢによって調節されるリソソーム遺伝子を示す図である。前立腺癌における発現は、カテプシンＢでは有意に減少したが、αグルコシダーゼでは増加した。１５０個の原発性前立腺癌及び２９個の非悪性組織のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｈｕｍａｎ　Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイ由来の発現プロファイリングデータ｛テイラー、２０１０＃９７６｝を定量して、リソソーム関連遺伝子の発現率変化を示した。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦０．０５、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。

【図１５】ＡＰＰＬ１遺伝子発現が前立腺癌において有意に増加したが、別のエンドソーム関連マーカーの発現は変わりやすいことを示す図である。１５０個の原発性前立腺癌及び２９個の非悪性組織のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｈｕｍａｎ　Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイ由来の発現プロファイリングデータ｛テイラー、２０１０＃９７６｝を定量して、エンドソーム関連遺伝子の発現率変化を示した。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦０．０５）。

【図１６】テイラーコホートからの知見を反映したトムリンス（Ｔｏｍｌｉｎｓ）らによるコホート由来のリソソーム遺伝子発現データを示す図である。前立腺癌組織の詳細な分析によって、前立腺癌進行中にエンドソーム遺伝子発現が変化することが明らかになった。２７個の非悪性組織、１３個の前立腺上皮内腫よう、３２個の原発性前立腺癌及び２２個の転移性癌組織試料のチナイヤン（Ｃｈｉｎｎａｉｙａｎ）ヒト２０Ｋ　Ｈｓ６アレイ由来の発現プロファイリングデータ｛トムリンス、２００７＃９７４｝を定量して、リソソーム関連遺伝子の発現の相対量を示した。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦

０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１）。
【図１７】有意に増加したトムリンスコホートにおけるエンドソーム遺伝子の発現を示す図である。一方、転移性前立腺癌組織は、エンドソーム遺伝子発現が変わりやすかった。２７個の非悪性組織、１３個の前立腺上皮内腫よう、３２個の原発性前立腺癌及び２２個の転移性癌組織試料のチナイヤンヒト２０Ｋ　Ｈｓ６アレイ由来の発現プロファイリングデータ｛トムリンス、２００７＃９７４｝を定量して、エンドソーム遺伝子発現の相対量を示した。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１）。
【図１８】リソソーム遺伝子のカプラン　マイヤー分析を示す図であり、ＢＣＲに基づく患者の層別化のための候補遺伝子としてカテプシンＢを示した。カテプシンＢは、遺伝子発現量に基づいて再発リスクのある患者を識別した。原発性癌において有意に変化することが以前に認められたリソソーム遺伝子の発現は、高リスク患者と低リスク患者で差がある傾向にあったが、有意ではなかった。グリンスキー（Ｇｌｉｎｓｋｙ）コホート｛グリンスキー、２００４＃９７９｝由来の患者を、遺伝子発現レベルに基づくＫ平均クラスタリングによって２つの群に層別化した（高－黒線、低－灰色線）。統計解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。
【図１９】エンドソーム遺伝子発現が患者を有意な予後群に層別化しなかったことを示す図である。グリンスキーコホート由来の患者を、ＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ４Ａ及びＲＡＢ７Ａ遺伝子発現の量に基づくＫ平均クラスタリングによって２つの群に層別化した（高－黒線、低－灰色線）。ゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって解析した。発現群間で統計的有意性は認められなかった。
【図２０】リソソーム遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析が、カテプシンＢ及びαガラクトシダーゼＡ発現に基づく低ＰＳＡタンパク質を発現する患者における有意な予知可能性を示す図である。（Ａ）患者を予後不良亜群と予後良好亜群に層別化するためのカットオフ識別レベルとして術前ＰＳＡレベル７．８ｎｇ／ｍＬを使用した。（Ｂ）ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの予後良好亜群から、ＬＩＭＰ２、ＬＡＭＰ１、カテプシンＢ又はαガラクトシダーゼＡの遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって患者を更に２つの群に層別化した（高発現－黒線、低発現－灰色線）。統計解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。統計的有意性をアステリスクで標識する（＊Ｐ≦０．０５、＊＊ｐ≦０．０１）。（Ｃ）前立腺癌再発における遺伝子発現の多変量解析。ＢＣＲ：生化学的再発（ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ｒｅｃｕｒｒｅｎｃｅ）；Ｇ－Ｂ－Ｗ：ゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定；ＨＲ：危険率（ｈａｚａｒｄ　ｒａｔｉｏ）；ＣＩ：信頼区間（ｃｏｎｆｉｄｅｎｃｅ　ｉｎｔｅｒｖａｌ）。
【図２１】ＲＡＢ５Ａ、ＡＰＰＬ１及びＥＥＡ１の混合遺伝子サインによって、低ＰＳＡ発現患者をＢＣＲに基づく予後の亜群に層別化できたことを示す図である。（Ａ）ＰＳＡ≦７．８ｍｇ／ｍＬを発現するグリンスキーコホート由来の患者をＲＡＢ５Ａ、ＡＰＰＬ１及びＥＥＡ１遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって群に層別化した。ＲＡＢ５Ａ、ＡＰＰＬ１及びＥＥＡ１の３遺伝子混合サインによって、ＢＣＲに基づいて患者を層別化した（Ｐ≦０．０２２１、ゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定；高発現－黒線、低発現－灰色線）。（Ｂ）前立腺癌再発における遺伝子発現の多変量解析。ＢＣＲ：生化学的再発；Ｇ－Ｂ－Ｗ：ゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定；ＨＲ：危険率；ＣＩ：信頼区間。
【図２２】非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来の分泌エンドソーム関連タンパク質の検出及び定量化を示す図である。（Ａ）非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰから分泌されたタンパク質の代表的なウエスタンブロット。（Ｂ）非悪性コントロール細胞（白棒）及び前立腺癌細胞（黒棒）における各タンパク質の量を濃度測定によって３つ組ウエスタンブロットから定量化した。有意差をアステリスクによって示した（＊Ｐ≦０．０５、＊＊ｐ≦０．０１）。
【図２３】Ａｐｐｌ１組換えタンパク質に対するウサギ抗Ａｐｐｌ１ポリクローナル抗体の親和性（パネルＡ）及びＲａｂ７組換えタンパク質に対するウサギ抗Ｒａｂ７ポリクロ

ーナル抗体の親和性（パネルＢ）を示す図である。
【図２４】パネルＡは（エピトープ＃１に対する）ユウロピウム標識ウサギ抗Ｒａｂ７ポリクローナル抗体の検量線を示し、パネルＢは、（エピトープ＃３に対する）ユウロピウム標識ウサギ抗Ａｐｐｌ１ポリクローナル抗体の検量線を示す図である。
【図２５】トムリンスらによるコホート由来のエンドソーム－リソソーム遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図２６－１】エンドソーム／リソソーム関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析、及び生化学的再発（ＢＣＲ）に基づく患者の層別化を示す図である。
【図２６－２】エンドソーム／リソソーム関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析、及び生化学的再発（ＢＣＲ）に基づく患者の層別化を示す図である。
【図２７－１】≦７．８ｎｇ／ｍＬ　ＰＳＡを発現する癌患者のエンドソーム－リソソーム遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存分析及び多変量解析を示す図である。
【図２７－２】≦７．８ｎｇ／ｍＬ　ＰＳＡを発現する癌患者のエンドソーム－リソソーム遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存分析及び多変量解析を示す図である。
【図２８】（Ａ）シンタキシン７及びシンタキシン１２の遺伝子発現の変化率を示す箱ひげグラフである。（Ｂ）トムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図２９】シンタキシン７及びシンタキシン１２遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す図である。
【図３０】細胞内及び分泌エンドソーム関連タンパク質の検出及び定量化を示す図である。
【図３１】ＦＧＦ１の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソー（Ｇｒａｓｓｏ）コホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図３２】ＦＧＦ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図３３】ＦＧＦ３の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図３４】ＦＧＦ１、ＦＧＦ２及びＦＧＦ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す図である。
【図３５】ＦＧＦ１、ＦＧＦ２及びＦＧＦ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す図である。
【図３６】ＦＧＦＲ１の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１）。
【図３７】ＦＧＦＲ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊ｐ≦０．００１）。
【図３８】ＦＧＦＲ３の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。
【図３９】ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２及びＦＧＦＲ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す図である。
【図４０】ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２及びＦＧＦＲ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す図である。
【図４１】非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来のＮＯＸ２タンパク質（６５（５

６）＆３０ｋＤａ）の検出及び定量化を示す図である。
【図４２】ＮＯＸ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１）。
【図４３】非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来のＮＯＸ４タンパク質の検出及び定量化を示す図である。
【図４４】ＮＯＸ４の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１、＊Ｐ≦０．０５）。
【図４５】前立腺組織におけるＡＰＰＬ１、Ｒａｂ７及びＬＩＭＰＩＩ発現を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
本開示は、特異的エンドソーム関連及び／又はリソソーム関連マーカーを前立腺癌の診断及び／又は予知に使用することができるという結論に基づく。
【００３７】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法を提供する。本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の進行を判定する方法を提供する。本開示のある実施形態は、選択されたマーカーの使用に基づく対象における前立腺癌を治療する方法を提供する。他の実施形態も本明細書に開示する。
【００３８】
ある開示実施形態は、効果の組合せを１つ以上有する。例えば、本明細書に開示した実施形態の効果の幾つかは、以下の１つ以上を含む：前立腺癌の診断及び／又は予知のための新しいクラスのマーカーの特定、ある場合には前立腺癌の診断と予知の両方に使用することができる１種以上のマーカー、組織試料、生検試料、血液、血しょうなどの生物試料において容易に検出可能である１種以上のマーカー、タンパク質に基づく１種以上のマーカーの使用、核酸に基づく１種以上のマーカーの使用、別のタイプのマーカーと併用することができる１種以上のマーカー、試料のハイスループット分析に適した方法の使用、前立腺癌を治療する薬理学的及び／又は外科的介入に適した対象を特定するのに役立つ方法の使用、キットにおける使用に適したマーカー、当該技術分野における１つ以上の問題に対処すること、当該技術分野において１つ以上の効果を提供すること、又は有用な商業的な選択肢を提供すること。ある実施形態の別の効果も本明細書に開示する。
【００３９】
本明細書に記載の通り、本開示は、対象における特異的エンドソーム関連及び／又はリソソーム関連マーカーが、前立腺癌を検出するのに使用することができるという結論に基づく。
【００４０】
さらに、本開示のある実施形態は、初期及び後期エンドソームの細胞生物学における独特の変化が前立腺癌細胞に生じるという認識に少なくとも部分的に基づく。理論に拘泥するものではないが、後期エンドソームは、通常、その外膜の陥入によって管腔内小胞を形成する（すなわち、多胞体とも呼ばれる後期エンドソーム内部の小胞を形成する）。これらの約１００ｎｍの内部小胞は、後期エンドソームが正常細胞表面に融合し、これらのエキソソーム小胞と一緒にその内容物を細胞から放出するときに、細胞から放出される可能性がある。エキソソームは、その形成される仕方のゆえに、細胞質タンパク質及びエンドソーム小胞機構を含み得る。正常コントロールにおいては、初期エンドソーム関連マーカーは、したがって、細胞から放出され、細胞外環境／循環中に検出することができる。前立腺癌細胞からの初期エンドソーム関連マーカーの放出がコントロール細胞に比べて特異的に減少するということが見いだされた。より重要なことに、異なる集団の初期エンドソ

ームに付随する小胞機構が前立腺癌細胞から放出されることが発見された。これは、初期エンドソームが、前立腺癌細胞において管腔内小胞を形成し得ることを示唆している。さらに、初期エンドソームは、前立腺癌細胞の原形質膜に融合し、これらの初期エンドソーム由来のエキソソーム小胞を優先的に放出することが発見された。さらに、エンドソーム生合成プロセスは、後期エンドソームではなく初期エンドソームにおいて管腔内小胞を形成するように変化することが発見された。これは、独特な一組の変化を前立腺癌細胞中の初期エンドソームと後期エンドソームの両方にもたらし、これらの異なるエンドソーム集団からのバイオマーカーを検出するときの比の基準も提供する。この比は、コントロール細胞に比べた前立腺癌における変化を特定するのに有効である。

【００４１】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法及びキットを提供する。

【００４２】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【００４３】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出し、それによって対象における前立腺癌を検出するステップを含む方法を提供する。

【００４４】

本開示のある実施形態は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出し、それによってそのように検出されたエンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーに基づいて前立腺癌を検出することによって、対象における前立腺癌を検出する方法を提供する。

【００４５】

ある実施形態においては、前立腺癌は、前立腺上皮内腫よう、原発性前立腺癌及び転移性前立腺癌から選択される。前立腺癌の他の形態及び／又は段階も企図される。

【００４６】

なお、一般には、グリーソン分類システムを使用して、前立腺癌を評価する。腫よう試料の様々な特徴に関連した「グリーソン」パターンと、続いて腫よう試料のパターンに割り当てられた段階との組合せに基づいて、「スコア」が前立腺癌に割り当てられる。グリーソンスコア２～４は、低侵襲性の癌とみなされる。スコア５～６は、中程度の侵襲性の癌とみなされる。スコア７は、中間の侵襲性の癌とみなされる。スコア８～１０は、高侵襲性の癌とみなされる。ある実施形態においては、前立腺癌は、上記スコアのいずれかのグリーソンスコアを有する癌である。

【００４７】

前立腺癌は、癌がどの程度進行したかの尺度であるステージによって分類することもできる。ステージ１では、癌は小さく、前立腺内に含まれる。ステージ２では、癌はより大きく、前立腺の両方の葉に存在し得るが、依然として器官に限局される。ステージ３では、癌は、前立腺を越えて広がり、隣接するリンパ腺又は精嚢に浸潤し得る。ステージ４では、癌は、別の器官又は骨に広がっている。ある実施形態においては、前立腺癌は、上記ステージのいずれかのステージ分類の癌である。

【００４８】

本開示は、ヒト対象における前立腺癌の検出に関連して記述されるものの、本開示は、動物対象における前立腺癌の検出も企図し、したがって本開示を獣医学に適用することも企図されることを理解されたい。

【００４９】

ある実施形態においては、対象は前立腺癌に罹患している。前立腺癌の例は、本明細書に記載の通りである。

【００５０】
本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象を検出する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【００５１】
ある実施形態においては、対象は、前立腺癌に罹患する尤度又はリスクの高い対象である。ある実施形態においては、対象は、前立腺癌を発症しやすい対象である。ある実施形態においては、対象は、前立腺癌に関連した１個以上の危険因子を有する対象である。ある実施形態においては、対象は、前立腺癌に罹患する尤度又はリスクが未知の対象である。
【００５２】
ある実施形態においては、対象は、ＰＳＡレベルが測定された、又はわかっている対象である。ＰＳＡレベルの例は、本明細書に記載の通りであり、例えば、本明細書の実施例８に記載の通りである。ある実施形態においては、対象は、図及び／又は実施例の１つ以上に記載の特性の１つ以上を有する対象である。
【００５３】
ある実施形態においては、対象は、前立腺癌の治療に適している。
【００５４】
「関連マーカー」という用語は、１個以上の特定の組織、細胞、細胞小器官及び／又は細胞区画に多く含まれ、それ自体単独で、又は別のマーカーと組み合わせて使用して、組織、細胞、細胞小器官及び／又は細胞区画の同定を助けることができるマーカーを指す。
【００５５】
ある実施形態においては、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーは、初期エンドソームマーカー、後期エンドソームマーカー、エンドソーム生合成に関連するマーカー、エンドソーム輸送に関連するマーカー、及びエンドソーム再利用に関連するマーカーの１種以上を含む。別のタイプのエンドソーム及びリソソームマーカーも企図される。マーカーが上記マーカーの１種であるかどうかを判定する方法は、当該技術分野で公知である。
【００５６】
ある実施形態においては、本明細書に記載の選択されたマーカーは、タンパク質、ポリペプチド、上記タンパク質若しくはポリペプチドの断片、誘導体若しくは加工体、ｍＲＮＡ、ミクロＲＮＡ、核ＲＮＡ、ｒＲＮＡ又は上記ＲＮＡの断片、加工若しくは未加工体を含めた核酸、脂質、細胞表面マーカー、受容体、又は補因子を含む。別のタイプのマーカーも企図される。
【００５７】
ある実施形態においては、選択されたマーカーは、タンパク質マーカー、及び／又はその断片、抗原性断片、誘導体若しくは加工体である。タンパク質を検出する方法は、当該技術分野で公知であり、例は本明細書にも記載されている。
【００５８】
ある実施形態においては、選択されたマーカーは、ＲＮＡマーカー、典型的には、ｍＲＮＡ、及び／又はその断片、誘導体若しくは加工体である。ｍＲＮＡを検出する方法は、当該技術分野で公知であり、例は本明細書にも記載されている。
【００５９】
本明細書に記載の通り、ある実施形態においては、ｍＲＮＡの検出は、ｍＲＮＡに相補的なｃＤＮＡ鎖の生成を必要とし得る。
【００６０】
ある実施形態においては、選択されたマーカーは、タンパク質マーカーとして有用であり得る。ある実施形態においては、選択されたマーカーは、ｍＲＮＡマーカーとして有用であり得る。ある実施形態においては、選択されたマーカーは、タンパク質マーカー及びｍＲＮＡマーカーとして有用であり得る。

【００６１】
ある実施形態においては、選択されたマーカーは、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む。

【００６２】
ある実施形態においては、選択されたマーカーは、例及び／又は図のいずれかに記載の１種以上のマーカーを含む。

【００６３】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上から選択されたマーカーを検出するステップを含む方法を提供する。

【００６４】
本開示の選択されたマーカーを本明細書では選択されたマーカーのヒト体と称することを理解されたい。しかし、等価なマーカーの検出及び／又は使用も企図されることを理解されたい。別の種の等価なマーカーは、当業者が容易に特定することができる。

【００６５】
マーカーを検出する方法は当該技術分野で公知である。一般に、対象におけるマーカーは、対象から採取された試料又は試料の加工体中に検出される。例えば、タンパク質及びＲＮＡを検出する方法は公知であり、一般に市販品を用いて実施することができる。タンパク質及びＲＮＡの検出、抽出及び単離のための方法を含めて、一般的方法は、その内容全体を参照により本明細書に援用する、例えば、アウスベル（Ａｕｓｕｂｅｌ）ら「分子生物学の最新手順（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）」ジョン・ワイリー・アンド・サンズ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ）（１９９７）に記載されている。

【００６６】
タンパク質マーカーの検出方法は公知であり、例えば、免疫結合、免疫ブロット（例えば、ウエスタン分析）、免疫沈降、免疫電気泳動法、免疫染色、免疫組織化学などの免疫学的検出方法、分光測光法、酵素アッセイ、質量分析法、及び顕微鏡法が挙げられる。別の方法も企図される。

【００６７】
核酸を検出する方法は公知であり、マイクロアレイ分析、ブロッティング（ノーザン、サザン）、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ＲＴ－ＰＣＲ、エンドポイントステムループ実時間ＲＴ－ＰＣＲ、ｍｉＲ－Ｑ　ＲＴ－ＰＣＲ、（Ａ）末端ユニバーサル逆転写（（Ａ）－Ｔａｉｌｅｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ）、ＲＮＡ増幅プロファイリング、クローニングに基づく方法、ナノ粒子を用いた方法、固定連結法（ｓｐｌｉｎｔｅｄ　ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｍｅｔｈｏｄｓ）、南京錠プローブ（ｐａｄｌｏｃｋ－ｐｒｏｂｅｓ）及びローリングサークル増幅、ビーズを用いたフローサイトメトリー法、生物発光ＲＮＡ検出法、分子ビーコン法、リボザイム法、及び定量的ＬＮＡ－ＥＬＦ－ＦＩＳＨ法が挙げられる。別の方法も企図される。

【００６８】
ある実施形態においては、ＲＮＡマーカーの検出は、逆転写を含む。ＲＮＡを逆転写する方法は当該技術分野で公知である。ある実施形態においては、ＲＮＡマーカーの検出は、核酸の増幅を含む。核酸増幅方法は当該技術分野で公知である。ある実施形態においては、ＲＮＡマーカーの検出は、ポリメラーゼ連鎖反応を含む。ある実施形態においては、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を含む。
【００６９】
ある実施形態においては、ＲＮＡマーカーの検出は、核酸と１個以上の標的核酸の結合又はハイブリダイゼーションを含む。ある実施形態においては、ＲＮＡマーカーの検出は、チップなどの固体基質に結合した１個以上の標的核酸と核酸の結合を含む。固体基質に結合した核酸との結合を含めて、核酸と標的核酸の結合方法は公知である。
【００７０】
ある実施形態においては、選択されたマーカーの検出は、ポリメラーゼ連鎖反応を含む。ある実施形態においては、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を含む。
【００７１】
ある実施形態においては、選択されたマーカーの検出は、免疫学的検出を含む。ある実施形態においては、免疫学的検出は、ＥＬＩＳＡ、抗体による染色、免疫組織化学、及び／又はフローサイトメトリー検出を含む。免疫学的検出を含む方法は、当該技術分野で公知である。
【００７２】
ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の１つ以上を検出するステップを含む。
【００７３】
ある実施形態においては、選択されたマーカーの存在の変化、レベルの変化、発現の変化、分泌の変化及び分布の変化の１つ以上は、対象における前立腺癌を示す。
【００７４】
ある実施形態においては、エンドソーム関連マーカーのレベルの増加及び／又は分泌の増加は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、エンドソーム関連マーカーのレベルの減少及び／又は分泌の減少は、対象における前立腺癌を示す。
【００７５】
ある実施形態においては、リソソーム関連マーカーのレベルの増加及び／又は分泌の増加は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、リソソーム関連マーカーのレベルの減少及び／又は分泌の減少は、対象における前立腺癌を示す。
【００７６】
ある実施形態においては、タンパク質マーカーのレベルの増加及び／又は分泌の増加は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、タンパク質マーカーのレベルの減少及び／又は分泌の減少は、対象における前立腺癌を示す。
【００７７】
ある実施形態においては、ｍＲＮＡマーカーのレベルの増加は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、ｍＲＮＡマーカーのレベルの減少は、対象における前立腺癌を示す。
【００７８】
ある実施形態においては、初期エンドソームマーカーのレベルの増加及び／又は分泌の増加は、対象における前立腺癌を示す。
【００７９】
ある実施形態においては、ＲＡＢ５タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ５タンパク質の分泌の増加、ＡＰＰＬ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＡＰＰＬ１タンパク質の分泌の増加、ＥＥＡ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＥＥＡ１タンパク質の分泌の増加、ＬＩＭＰ－２タンパク質及び／又はｍＲＮ

Ａのレベルの増加、ＴＦＲ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＴＦＲ２タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ４タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＲＡＢ４タンパク質の分泌の増加、ＡＰＰＬ２タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＬＡＭＰ１タンパク質及び／又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＲＡＢ１１タンパク質の分泌の増加、ＲＡＢ７タンパク質の分泌の減少、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、カテプシンＤタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、αガラクトシダーゼタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＳＴＸ７タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＳＴＸ１２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質の分泌の増加、ＳＤＣＢＰタンパク質の分泌の減少、ＳＯＲＴ１タンパク質の分泌の減少、ＦＧＦ１タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦ３タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＦＧＦＲ１タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦＲ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの減少、ＦＧＦＲ３タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＮＯＸ２タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、及びＮＯＸ４タンパク質又はｍＲＮＡのレベルの増加、ＡＰＰＬ１タンパク質の核及び／又は核小体レベルの増加、ＲＡＢ７タンパク質の核膜レベルの増加、並びにＬＩＭＰ２タンパク質陽性小胞の増大のうち１つ以上が、対象における前立腺癌を示す。

【００８０】

ある実施形態においては、１種以上のマーカーの存在の変化、レベルの変化、発現の変化、分泌の変化及び分布の変化を、非悪性組織、前立腺上皮内腫よう、原発性前立腺癌及び転移性前立腺癌の１種以上と比較する。

【００８１】

ある実施形態においては、ＬＩＭＰ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも増加する、ＬＡＭＰ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも減少する、ＬＡＭＰ１タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも減少する、カテプシンＢタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも増加する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、酸性セラミダーゼタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、ＡＰＰＬ１タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて非悪性前立腺よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、ＡＰＰＬ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも増加する、ＲＡＢ５タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＥＥＡ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＥＥＡ１タンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において非悪性前立腺よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて原発性前立腺癌よりも減少する、ＲＡＢ４Ａタンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において転移性前立腺癌よりも減少する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも増加する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも減少する、ＭＹＯ１Ｂタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ようにおいて転移性前立腺癌よりも減少する、ＰＤＣＤ６ＩＰタンパク質又はｍＲＮＡが、前立腺上皮内腫ように

おいて非悪性前立腺よりも減少する、ＳＤＣＢＰタンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＳＴＸ７タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において原発性前立腺癌よりも減少する、ＦＧＦＲ１タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも増加する、ＦＧＦＲ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも減少する、ＮＯＸ２タンパク質又はｍＲＮＡが、原発性前立腺癌において非悪性組織よりも増加する、及びＮＯＸ４タンパク質又はｍＲＮＡが、転移性前立腺癌において前立腺上皮内腫ようよりも増加する。

【００８２】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、生物試料を対象から得るステップを含む。

【００８３】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、生物試料を加工して、選択されたマーカーの検出を可能にするステップを含む。ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、生物試料を加工して、本明細書に記載のマーカーの検出を可能にするステップ、及び加工試料中のマーカーを検出するステップを含む。ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、生物試料を対象から得るステップ、及び生物試料を加工して、選択されたマーカーの検出を可能にするステップを含む。

【００８４】

「生物試料」という用語は、対象から得られる試料、及び／又はその加工及び／又は処理体を指す。例えば、生物試料は、未処理とすることができ、希釈することができ、誘導体とすることができ、抽出物とすることができ、処理体とすることができ、事前浄化（ｐｒｅ－ｃｌｅａｒｅｄ）することができ、ろ過することができ、脱塩することができ、濃縮することができ、希釈することができ、緩衝することができ、遠心分離することができ、誘導することができ、前処理することができ、加工して、１種以上の成分若しくは不純物を試料から除去することができ、スライスすることができ、固定することができ、スライドに接着させることができ、又は適切なその組合せとすることができる。ある実施形態においては、選択されたマーカーを試料中で直接検出する。ある実施形態においては、選択されたマーカーを、加工及び／又は処理後の試料中で検出する。ある実施形態においては、選択されたマーカーを検出する前に、及び／又は選択されたマーカーを検出するのと同時に、試料を加工及び／又は処理する。

【００８５】

生物試料の例としては、血液、血しょう、尿、羊水、涙、唾液などの１つ以上の体液、毛、皮膚、及び１個以上の組織試料又は生検試料が挙げられる。別のタイプの生物試料も企図される。

【００８６】

ある実施形態においては、生物試料は、血液試料、血しょう試料、血清試料、生検試料及び前立腺組織試料の１つ以上を含む。

【００８７】

ある実施形態においては、生物試料は、生検試料又は組織試料を含む。ある実施形態は、選択されたマーカーの生体内原位置レベルを検出する。

【００８８】

ある実施形態においては、選択されたマーカーは、１種以上の血液マーカー、血しょうマーカー及び／又は血清マーカーを含む。ある実施形態は、選択されたマーカーの循環レベルを検出する。

【００８９】

ある実施形態においては、検出は、定性的測定を含む。ある実施形態においては、検出は、選択されたマーカーが存在の変化、レベルの変化、発現の変化、分泌の変化及び分布の変化の１つ以上を有するかどうかの定性的測定を含む。ある実施形態においては、検出は、選択されたマーカーが存在の変化、レベルの変化、発現の変化、分泌の変化及び分布の変化の１つ以上を有するかどうかの定量的測定を含む。

【００９０】
ある実施形態においては、検出は、定性的測定を含む。ある実施形態においては、検出は、選択されたマーカーが存在するかしないかの定性的測定を含む。ある実施形態においては、検出は、選択されたマーカーのレベルの定量的評価を含む。例えば、ある方法は、選択されたマーカーの濃度の定量化を可能にする。マーカー濃度の計算又は測定方法は、当該技術分野で公知である。
【００９１】
本開示のある実施形態は、２種以上の選択されたマーカーを検出するステップを含む。本開示のある実施形態は、３種以上の選択されたマーカーを検出するステップを含む。本開示のある実施形態は、４種以上の選択されたマーカーを検出するステップを含む。
【００９２】
ある実施形態においては、本開示の方法は、選択されたマーカーの２種以上を検出するステップを含む。ある実施形態においては、方法は、選択されたマーカーの３種以上を検出するステップを含む。ある実施形態においては、方法は、選択されたマーカーの４種以上を検出するステップを含む。
【００９３】
本開示のある実施形態は、以下の選択されたマーカーの２種以上を検出するステップを含む：カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体。
【００９４】
本開示のある実施形態は、以下の選択されたマーカーの３種以上を検出するステップを含む：カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体。
【００９５】
本開示のある実施形態は、以下の選択されたマーカーの４種以上を検出するステップを含む：カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体。
【００９６】
ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、１種の選択されたマーカーと別の選択されたマーカーのレベルの比を求めるステップを含む。
【００９７】
ある実施形態においては、比の変化は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、非悪性組織と比べた比の変化は、対象における前立腺癌を示す。異なるタイプの前立腺組織の別の形式の比較も本明細書に記載する。
【００９８】

ある実施形態においては、初期エンドソームマーカーと後期エンドソームマーカーの比の増加は、対象における前立腺癌を示す。ある実施形態においては、非悪性組織と比べた初期エンドソームマーカーと後期エンドソームマーカーの比の増加は、対象における前立腺癌を示す。

【００９９】

ある実施形態においては、本開示の方法は、選択されたマーカーに加えて１種以上の別のマーカーを検出するステップを含む。

【０１００】

ある実施形態においては、本開示の方法は、本明細書に記載の通り、１種以上のマーカー、コントロールマーカー及び／又は基準マーカーを使用する。

【０１０１】

マーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の変化は、一般に、１つ以上のコントロール対象及び／又は前立腺癌を有することがわかっている１つ以上の対象における１種以上の対応するマーカー、例えば、１種以上の対応するタンパク質又はｍＲＮＡのレベルに対する相対的なものである。

【０１０２】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布を、対象における前立腺癌を示すことが知られている、及び／又は癌がないことを示すことが知られている１種以上の別のマーカーと比較するステップを含む。

【０１０３】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布を１種以上の基準及び／又はコントロールマーカーと比較するステップを含む。

【０１０４】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、選択されたマーカーの存在及び／又はレベルを、対象における前立腺癌のリスクの変化に関連する１種以上の別のマーカー及び／又は前立腺癌の有無を示すことが知られている１種以上の別のマーカーの存在及び／又はレベルと比較するステップを含む。

【０１０５】

ある実施形態においては、基準マーカーは、内在性マーカーを含む。ある実施形態においては、基準マーカーは、外因性マーカーを含む。例えば、試料に外因性基準マーカーを固定することができる。

【０１０６】

ある実施形態においては、１種以上の別のマーカーは、前立腺特異抗原（ＰＳＡ：ｐｒｏｓｔａｔｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ）を含む。

【０１０７】

ある実施形態においては、本開示の方法は、生物試料を加工して、選択されたマーカーの検出を可能にするステップを含む。ある実施形態においては、本開示の方法は、対象から得られる生物試料を加工して、選択されたマーカーの検出を可能にするステップを含む。対象は本明細書に記載の通りである。

【０１０８】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法及びキットは、分析のために試料を加工するための１種以上の試薬の使用を含む。

【０１０９】

ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、さらに、対象の１つ以上の臨床特徴に関する情報を得るステップと、選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上と情報を組み合わせて使用して、対象における前立腺癌を検出するステップとを含む。ある実施形態においては、１つ以上の臨床特徴は、年齢、肥満度指数、喫煙、癌及び／又は前立腺癌の遺伝学及び家族歴の１つ以上を含む。

【０１１０】
ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、さらに、対象の１つ以上の臨床特徴に関する情報を得るステップと、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の１つ以上と情報を組み合わせて使用して、対象における前立腺癌、又は前立腺癌がないことを検出するステップとを含む。
【０１１１】
ある実施形態においては、本明細書に記載の方法は、選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に関連したデータを処理するコンピュータプロセッサ手段を使用して、対象における前立腺癌の存在の尤度及び／又はリスクを生成するステップを含む。コンピュータプロセッサ手段の例は、公知である。
【０１１２】
ある実施形態においては、方法の検出感度は０．６０以上である。ある実施形態においては、方法の検出感度は０．７０以上である。ある実施形態においては、方法の検出感度は０．８０以上である。ある実施形態においては、方法の検出感度は０．９０以上である。ある実施形態においては、方法の検出感度は０．９５以上である。
【０１１３】
ある実施形態においては、方法の検出特異性は０．６０以上である。ある実施形態においては、方法の検出特異性は０．７０以上である。ある実施形態においては、方法の検出特異性は０．８０以上である。ある実施形態においては、方法の検出特異性は０．９０以上である。ある実施形態においては、方法の検出特異性は０．９５以上である。
【０１１４】
ある実施形態においては、本明細書に記載の方法を使用して、対象における前立腺癌を診断する、対象における前立腺癌をスクリーニングする、予後を評価する、前立腺癌の転移能を求める、前立腺癌に罹患した対象を特定する、前立腺癌を発症しやすい対象を特定する、対象における前立腺癌の再発率を求める、対象における前立腺癌による死亡リスクを求める、前立腺癌を層別化する、対象における前立腺癌と前立腺癌ではないことを識別する、前立腺癌が臓器限局性癌であるかどうかを判定する、前立腺癌と良性前立腺肥大症、前立腺炎及び前立腺炎症性症状の１つ以上を識別する、病原の悪化を判定する、前立腺癌の増殖が遅いかどうか、前立腺癌が無痛性であるかどうか、又は侵襲性であるかどうか評価する、対象における前立腺癌の存在を排除する、前立腺癌の治療及び／又は手術が適切な対象を特定する、並びに対象が前立腺癌を有する尤度又はリスクを求める。
【０１１５】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、
生物試料を対象から得るステップ、
試料を加工して、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーの検出を可能にするステップ、
加工試料における選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の変化の１つ以上を検出するステップ、並びに
対象における前立腺癌を特定するステップを含む方法を提供する。
【０１１６】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、
生物試料を対象から得るステップ、
試料を加工して、試料中のマーカーの検出を可能にするステップ、
カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２、ＮＯＸ４、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種

以上について、加工試料における選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の変化を検出するステップ、並びに
対象における前立腺癌を特定するステップを含む方法を提供する。
【０１１７】
本開示のある実施形態は、添付の例及び／又は図のいずれかを参照して実質的に本明細書に記載されたように、対象における前立腺癌を検出する方法を提供する。
【０１１８】
本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法又はキットを提供する。
【０１１９】
本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【０１２０】
本開示のある実施形態は、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含み、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の変化のうち１つ以上の変化が、対象が前立腺癌に罹患した、又は前立腺癌を発症しやすいことを示す方法を提供する。
【０１２１】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する方法であって、例及び／又は図のいずれかを参照して上述した対象からマーカーを検出するステップを含む方法を提供する。
【０１２２】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法又はキットを提供する。
【０１２３】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【０１２４】
ある実施形態においては、方法を使用して、前立腺癌に罹患した対象、又は前立腺癌を発症しやすい対象を特定する。
【０１２５】
ある実施形態においては、方法を使用して、前立腺癌に罹患していない対象、又は前立腺癌を発症しにくい対象を除外する。
【０１２６】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含み、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の変化のうち１つ以上の変化が、対象における前立腺癌を示す方法を提供する。
【０１２７】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌をスクリーニングする方法であって、例及び／又は図のいずれかを参照して上述した対象からマーカーを検出するステップを含む方法を提供する。
【０１２８】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の診断のための方法又はキットを提供する。
【０１２９】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出するための診断方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【０１３０】

本開示のある実施形態は、対象が前立腺癌に罹患する、又は前立腺癌を発症しやすい尤度及び／又はリスクを求める方法又はキットを提供する。

【０１３１】

本開示のある実施形態は、対象が前立腺癌に罹患する、又は前立腺癌を発症しやすい尤度及び／又はリスクを求める方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【０１３２】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の進行を判定する方法又はキットを提供する。

【０１３３】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の進行を判定する方法であって、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む方法を提供する。

【０１３４】

ある実施形態においては、方法は、癌の生化学的再発、再発率及び／又は生存率を求めるステップを含む。

【０１３５】

ある実施形態においては、マーカーのレベルは、再発率の減少及び／又は生存率の増加を示す。ある実施形態においては、マーカーは、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ７Ａ、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む。

【０１３６】

ある実施形態においては、マーカーは、減少した若しくはより低いＬＩＭＰ２、増加した若しくはより高いカテプシンＢ、増加した若しくはより高いカテプシンＤ、増加した若しくはより高いαガラクトシダーゼ、減少した若しくはより低いＲＡＢ５Ａ、減少した若しくはより低いＥＥＡ１、増加した若しくはより高いＲＡＢ７Ａ、増加した若しくはより高いＭ６ＰＲ、減少した若しくはより低いＩＧＦＲ２、減少した若しくはより低いＳＯＲＴ１、減少した若しくはより低いＭＹＯ１Ｂ、増加した若しくはより高いＰＤＣＤ６ＩＰ、増加した若しくはより高いＳＴＸ１２、増加した若しくはより高いＦＧＦ２、増加した若しくはより高いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む。

【０１３７】

ある実施形態においては、方法は、さらに、対象におけるＰＳＡ発現レベルを確認するステップ、及び対象におけるＰＳＡ発現レベルに基づいてマーカーの発現を層別化するステップを含む。ＰＳＡレベルは、本明細書に記載の通りである。

【０１３８】

ある実施形態においては、ＰＳＡは、低リスクの前立腺癌を示すレベルである。ある実施形態においては、ＰＳＡレベルは１０ｎｇ／ｍｌ未満である。

【０１３９】

ある実施形態においては、ＰＳＡは７．８ｎｇ／ｍｌ以下のレベルである。ある実施形態においては、マーカーは、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮ

Ａ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む。

【０１４０】

ある実施形態においては、マーカーは、減少した若しくはより低いＬＩＭＰ２、増加した若しくはより高いカテプシンＢ、増加した若しくはより高いαガラクトシダーゼ、減少した若しくはより低いＲＡＢ５Ａ、減少した若しくはより低いＥＥＡ１、増加した若しくはより高いＭ６ＰＲ、減少した若しくはより低いＩＧＦＲ２、減少した若しくはより低いＳＯＲＴ１、減少した若しくはより低いＭＹＯ１Ｂ、増加した若しくはより高いＰＤＣＤ６ＩＰ、増加した若しくはより高いＳＤＣ１、増加した若しくはより高いＳＴＸ１２、増加した若しくはより高いＦＧＦ２、増加した若しくはより高いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む。

【０１４１】

ある実施形態においては、マーカーのレベルは、再発率の増加及び／又は生存率の減少を示す。ある実施形態においては、マーカーは、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、カテプシンＤ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ７Ａ、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む。

【０１４２】

ある実施形態においては、マーカーは、増加した若しくはより高いＬＩＭＰ２、減少した若しくはより低いカテプシンＢ、減少した若しくはより低いカテプシンＤ、減少した若しくはより低いαガラクトシダーゼ、増加した若しくはより高いＲＡＢ５Ａ、増加した若しくはより高いＥＥＡ１、減少した若しくはより低いＲＡＢ７Ａ、減少した若しくはより低いＭ６ＰＲ、増加した若しくはより高いＩＧＦＲ２、増加した若しくはより高いＳＯＲＴ１、増加した若しくはより高いＭＹＯ１Ｂ、減少した若しくはより低いＰＤＣＤ６ＩＰ、減少した若しくはより低いＳＴＸ１２、減少した若しくはより低いＦＧＦ２、減少した若しくはより低いＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む。

【０１４３】

ある実施形態においては、方法は、さらに、対象におけるＰＳＡ発現レベルを確認するステップ、及び対象におけるＰＳＡ発現レベルに基づいてマーカーの発現を層別化するステップを含む。ある実施形態においては、ＰＳＡは、低リスクの前立腺癌を示すレベルである。ある実施形態においては、ＰＳＡレベルは１０ｎｇ／ｍｌ未満である。ある実施形態においては、ＰＳＡは７．８ｎｇ／ｍｌ以下のレベルである。

【０１４４】

ある実施形態においては、マーカーは、ＬＩＭＰ２、カテプシンＢ、αガラクトシダーゼ、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、及び／又は前記のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１種以上を含む。

【０１４５】

ある実施形態においては、マーカーは、増加した若しくはより高いＬＩＭＰ２、減少した若しくはより低いカテプシンＢ、減少した若しくはより低いαガラクトシダーゼ、増加した若しくはより高いＲＡＢ５Ａ、増加した若しくはより高いＥＥＡ１、減少した若しくはより低いＭ６ＰＲ、増加した若しくはより高いＩＧＦＲ２、増加した若しくはより高いＳＯＲＴ１、増加した若しくはより高いＭＹＯ１Ｂ、減少した若しくはより低いＰＤＣＤ６ＩＰ、減少した若しくはより低いＳＤＣ１、減少した若しくはより低いＳＴＸ１２、減少した若しくはより低いＦＧＦ２、減少した若しくはより低いＦＧＦ３、及び／又は前記

のうち１種をコードするｍＲＮＡ、前記のうち１種の断片、前記のうち１種の誘導体、及び前記のうち１種の加工体の１つ以上を含む。

【０１４６】

本開示のある実施形態は、本明細書に記載の方法を実施するキットを提供する。キットは、本明細書に記載の１つ以上の成分、試薬及び／又は説明書を含むことができる。

【０１４７】

ある実施形態においては、キットは、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布を決定するための１つ以上の試薬及び／又は説明書を含む。

【０１４８】

本開示のある実施形態は、前立腺癌を治療する方法を提供する。

【０１４９】

「治療すること」という用語及び「治療」、「治療する」などの関連用語は、対象の症状を改善することに関して所望の効果を得ること、対象における１つ以上の症候の回復、抑止、抑制、緩和及び／又は進行の遅延、対象の部分的若しくは完全な安定化、１つ以上の症候の軽減、又は対象における疾患、症状若しくは状態の治癒を指す。

【０１５０】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を治療する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップ、並びに

検出された選択されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に基づいて対象を治療するステップを含む方法を提供する。

【０１５１】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を治療する方法であって、

本明細書に記載のマーカーを検出するステップ、及び

そのように検出されたマーカーの存在、レベル、分泌及び分布の１つ以上に基づいて対象を治療するステップを含む方法を提供する。

【０１５２】

ある実施形態においては、治療するステップは、外科的介入、放射線療法及び治療薬投与の１つ以上を含む。

【０１５３】

本開示のある実施形態は、本明細書に記載の通り、検出された選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の１つ以上に基づく対象への外科的介入によって前立腺癌を治療する方法を提供する。前立腺癌の外科的介入方法は、当該技術分野で公知である。

【０１５４】

本開示のある実施形態は、本明細書に記載の通り、検出された選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の１つ以上に基づいて有効量の治療薬を対象に投与することによって前立腺癌を治療する方法を提供する。前立腺癌の薬理学的介入方法は、当該技術分野で公知である。

【０１５５】

本開示のある実施形態は、本明細書に記載の通り、検出された選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布の１つ以上に基づく放射線療法によって前立腺癌を治療する方法を提供する。前立腺癌の放射線療法は、当該技術分野で公知である。

【０１５６】

ある実施形態においては、治療は、本明細書に記載の通り、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布存在の１つ以上が、前立腺癌の存在、及び／又は前立腺癌の尤度若しくはリスクの増加を示しているときに行われる。

【０１５７】

ある実施形態においては、選択されたマーカーの存在、レベル、発現、分泌及び分布レベルの変化の１つ以上が、対象が治療に適していることを示す。存在、レベル、発現、分

泌及び分布の変化は、本明細書に記載の通りである。

【０１５８】

ある実施形態においては、選択されたマーカーのレベルの増加が、対象が治療に適していることを示す。ある実施形態においては、選択されたマーカーのレベルの減少が、対象が治療に適していることを示す。ある実施形態においては、選択されたマーカーの下方制御が、対象が治療に適していることを示す。ある実施形態においては、選択されたマーカーの上方制御が、対象が治療に適していることを示す。ある実施形態においては、１種の選択されたマーカーの下方制御及び／又は別の選択されたマーカーの上方制御が、対象が治療に適していることを示す。

【０１５９】

本明細書に記載の通り、本開示のある実施形態は、以下のように方法を提供する：対象における前立腺癌を診断すること、対象における前立腺癌をスクリーニングすること、予後を評価すること、前立腺癌の転移能を求める、前立腺癌に罹患した対象を特定すること、前立腺癌を発症しやすい対象を特定すること、対象における前立腺癌の再発率を求めること、対象における前立腺癌による死亡リスクを求めること、前立腺癌を層別化すること、対象における前立腺癌と前立腺癌ではないことを識別すること、前立腺癌が臓器限局性癌であるかどうかを判定すること、前立腺癌と良性前立腺肥大症、前立腺炎及び前立腺炎症性症状の１つ以上を識別すること、病原の悪化を判定すること、前立腺癌の増殖が遅いかどうか、前立腺癌が無痛性であるかどうか、又は侵襲性であるかどうか評価すること、対象における前立腺癌の存在を排除すること、前立腺癌の治療及び／又は手術が適切な対象を特定すること、並びに対象が前立腺癌を有する尤度又はリスクを求めること。エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーは、本明細書に記載の通りである。マーカーを検出する方法は、本明細書に記載の通りである。

【０１６０】

本開示のある実施形態は、前立腺癌を発症しやすい対象、又は前立腺癌に罹患した対象の予後を評価する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６１】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の転移能を求める方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６２】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の再発率を求める方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６３】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の死亡リスクを求める方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６４】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を層別化する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６５】

本開示のある実施形態は、前立腺癌である対象と前立腺癌でない対象を識別する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６６】

本開示のある実施形態は、前立腺癌が対象における臓器限局性癌であるかどうかを判定

する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６７】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌と良性前立腺肥大症、前立腺炎及び前立腺炎症性症状の１つ以上を識別する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６８】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の病原の悪化を判定する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１６９】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の増殖が遅いかどうか、前立腺癌が無痛性であるかどうか、又は侵襲性であるかどうか評価する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１７０】

本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌の存在を排除する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１７１】

本開示のある実施形態は、前立腺癌の治療及び／又は手術が適切な対象を特定する方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１７２】

本開示のある実施形態は、対象が前立腺癌を有する尤度又はリスクを求める方法又はキットを提供する。この方法は、エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを対象から検出するステップを含む。

【０１７３】

本開示のある実施形態は、前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーを特定する方法又はキットを提供する。本開示のある実施形態は、前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーをスクリーニングする方法を提供する。

【０１７４】

マーカーを特定及び／又はスクリーニングする方法は、本明細書に記載の通りである。

【０１７５】

本開示のある実施形態は、前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーを特定する方法であって、

エンドソーム関連マーカー及び／又はリソソーム関連マーカーから選択されたマーカーを特定するステップ、並びに

前立腺癌を診断及び／又は予知する選択されたマーカーの能力を判定するステップを含み、

それによってマーカーを前立腺癌の診断及び／又は予知のための選択されたマーカーであると確認する方法を提供する。

【０１７６】

本開示のある実施形態は、前立腺癌の診断及び／又は予知に使用される本明細書に記載の方法によって特定されたマーカーを提供する。

【０１７７】

本開示のある実施形態は、単離及び／又は精製抗体、及び／又はその抗原結合性断片を提供する。抗体及びその断片は、本明細書に記載の通りである。抗体及びその抗原結合性断片は、本明細書に記載のキットにおける使用など、例えば、前立腺癌を検出するのに使

用することができる。

【０１７８】

「抗体」という用語は、別の分子の抗原性領域に結合する能力を有する免疫グロブリン分子を意味すると理解すべきであり、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、又は１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎ）を含む分子など、特異的抗原結合を与えるのに十分な免疫グロブリン（又は免疫グロブリンの変異体）の少なくとも一部を含むポリペプチドを含めて、所望の親和性を有する別の分子の抗原性領域に結合する能力を有するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、及び免疫グロブリン分子の断片、又はその組合せを含む。

【０１７９】

ある実施形態においては、抗体（又はその抗原結合性断片）は、抗原に対して少なくとも$10^{6}M^{-1}$、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、少なくとも$10^{8}M^{-1}$、少なくとも$10^{9}M^{-1}$、少なくとも$10^{10}M^{-1}$、少なくとも$10^{11}M^{-1}$又は少なくとも$10^{12}M^{-1}$の親和性を有する。

【０１８０】

抗体は、当該技術分野において公知の方法によって生成することができる。抗体を製造する場合、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトなどを含めた種々の宿主に適切な抗原を注射して免疫することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを使用して免疫応答を増大させることができる。かかる標準アジュバントとしては、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、並びにリゾレシチン、Ｐｌｕｒｏｎｉｃポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの表面活性物質が挙げられる。

【０１８１】

ある実施形態においては、抗体は、ポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体を製造及び単離する方法は公知である。一般に、ポリクローナル抗体は、Ｂリンパ球から産生される。一般に、ポリクローナル抗体は、免疫動物などの免疫対象から直接得られる。免疫方法は、当該技術分野で公知である。

【０１８２】

ある実施形態においては、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、培養において連続単離細胞による抗体分子の製造のための技術を用いて調製することができる。これらとしては、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術及びＥＢＶハイブリドーマ技術が挙げられるが、それだけに限定されない。モノクローナル抗体の調製方法としては、例えば、コーラー（Ｋｏｈｌｅｒ）ら（１９７５）ネイチャー（Ｎａｔｕｒｅ）２５６：４９５－４９７（参照により本明細書に援用する）、コズボル（Ｋｏｚｂｏｒ）ら（１９８５）ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ）８１：３１－４２（参照により本明細書に援用する）、コート（Ｃｏｔｅ）ら（１９８３）科学アカデミー紀要（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ）８０：２０２６－２０３０（参照により本明細書に援用する）、及びコール（Ｃｏｌｅ）ら（１９８４）モレキュラ・アンド・セル・バイオロジー（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．）６２：１０９－１２０（参照により本明細書に援用する）が挙げられる。

【０１８３】

ある実施形態においては、抗体及び／又はその抗原結合性断片は、単離抗体を含む。ある実施形態においては、抗体及び／又はその抗原結合性断片は、精製抗体を含む。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を製造及び単離する方法は公知である。

【０１８４】

「単離」という用語は、その自然環境から分離された核酸、ポリペプチド、抗体などの種を指す。本開示のある実施形態は、本明細書に記載の単離された核酸、ポリペプチド、タンパク質又は抗体を提供する。

【０１８５】

単離核酸、ポリペプチド又は抗体は、部分的に又は十分に精製することができる。ある場合には、単離実体は、実質的に未精製状態であり、種々の別の種が付随する。ある場合には、単離実体は十分に精製された状態であり、天然に又は生体内で付随する他の物質を実質的に含まない。「精製」という用語は、所望の種の割合を増加させるある形態のプロセスを経た種を指す。本開示のある実施形態は、本明細書に記載の精製された核酸、ポリペプチド、タンパク質又は抗体を提供する。

【０１８６】

ある実施形態においては、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ及びＩｇＡからなる群から選択されるアイソタイプを有する。

【０１８７】

ある実施形態においては、抗体及び／又はその抗原結合性断片は、マウス抗体及び／又はその抗原結合性断片、ヒト抗体及び／又はその抗原結合性断片、又はヒト化抗体及び／又はその抗原結合性断片である。別のタイプの抗体（又はその抗原結合性断片）も企図される。

【０１８８】

ヒト化抗体、又は別のほ乳動物によって拒絶されないように改変された抗体は、例えば、リサーフェシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）又はＣＤＲ移植を含めて、当該技術分野で公知の適切な方法によって製造することができる。リサーフェシング技術では、分子モデリング、統計解析及び変異誘発を組み合わせて、可変領域の非ＣＤＲ表面を標的宿主の公知の抗体の表面に似るように調節する。抗体のリサーフェシングのための戦略及び方法、並びに異なる宿主内の抗体の免疫原性を低下させる別の方法は、例えば米国特許第５，６３９，６４１号に記載のように、公知である。抗体のヒト化体は、ＣＤＲ移植によって、例えばマウス抗体の相補性決定領域をヒト枠組みドメインに代入することによって製造することもできる。

【０１８９】

抗体をヒト化する方法は公知である。例えば、抗体は、米国特許第６，１８０，３７０号（参照により本明細書に援用する）、国際公開第９２／２２６５３号（参照により本明細書に援用する）、ライト（Ｗｒｉｇｈｔ）ら（１９９２）クリティカル・レビュー・イン・イムノロジー（Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖ．Ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．）１２（３，４）：１２５－１６８（参照により本明細書に援用する）、及びグ（Ｇｕ）ら（１９９７）スロンボシス・アンド・ヘマトシスト（Ｔｈｒｏｍｂｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｈｅｍａｔｏｃｙｓｔ）７７（４）：７５５－７５９）（参照により本明細書に援用する）に記載のように生成することができる。

【０１９０】

ヒト化抗体は、一般に、定常領域と、ヒト抗体に実質的又は独占的に由来する相補性決定領域（ＣＤＲ）及び目的の非ヒト抗体に実質的又は独占的に由来するＣＤＲ以外の可変領域とを有する。

【０１９１】

「キメラ抗体」の製造のために開発された技術、例えば、適切な抗原特異性及び生物活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングを適切な方法によって実施することができる。例えば、キメラ抗体は、モリソン（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ），Ｓ．Ｌ．ら（１９８４）科学アカデミー紀要（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ）８１：６８５１－６８５５（参照により本明細書に援用する）、ニューバーガー（Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ），Ｍ．Ｓ．ら（１９８４）ネイチャー３１２：６０４－６０８（参照により本明細書に援用する）、及びタケダ（Ｔａｋｅｄａ），Ｓ．ら（１９８５）ネイチャー３１４：４５２－４５４（参照により本明細書に援用する）に記載のように製造することができる。

【０１９２】

所望の特異性を有する抗体及び／又はその抗原結合性断片を特定するスクリーニングに免疫測定法を使用することができる。

【０１９３】
抗体分子及びその抗原結合性断片は、当該技術分野で公知の方法によって、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現系における発現によって、組換え製造することもできる。例えば、組換え抗体製造方法は、米国特許第４，８１６，５６７号に記載されている（参照により本明細書に援用する）。抗原結合性断片は、例えば、当該技術分野で公知である、ファージディスプレイ技術によって、又はペプチドライブラリーを使用して、製造することもできる。
【０１９４】
本開示のある実施形態は、本明細書に記載のポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。
【０１９５】
本開示のある実施形態は、ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）及びＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。本開示のある実施形態は、前記アミノ酸配列の１つ以上からなるポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。
【０１９６】
ある実施形態においては、抗体又はその抗原結合性断片は、ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、及びＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）、ＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶ（配列番号７）、ＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲ（配列番号８）、及びＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧＧＫＫＲ（配列番号９）のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体からなる１種以上のポリペプチドに対して産生される。
【０１９７】
本開示のある実施形態は、本明細書に記載のポリペプチド又はタンパク質も提供する。
【０１９８】
本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）、及びＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶ（配列番号７）、ＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲ（配列番号８）、ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧＧＫＫＲ（配列番号９）、前記アミノ配列のいずれかの断片、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体の１つ以上からなるポリペプチドを提供する。ある実施形態においては、ポリペプチドは、単離ポリペプチドである。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。
【０１９９】
本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）、及びＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶ（配列番号７）、ＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲ（配列番号８）、ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧＧＫＫＲ（配列番号９）、前記アミノ配列のいずれかの断片、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体の１つ以上を含む非天然ポリペプチドを提供する。ある実施形態にお

いては、ポリペプチドは、単離ポリペプチドである。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。

【０２００】

本開示のある実施形態は、ＡＳＮＤＨＤＡＡＩＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶＫＹＥＶＴＥＤＶＹＴ（配列番号１）、ＤＥＶＡＳＤＰＬＹＶＰＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲＫＡＧＹＬＮＡＲＮＫＴ（配列番号２）、ＳＥＧＱＦＶＶＬＳＳ　ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧ　ＧＫＫＲＥＳＥＡ（配列番号３）の１つ以上を含むヒトＡＰＰＬ１タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体を提供する。関連標的の等価な結合領域を特定する方法は、当該技術分野で公知である。

【０２０１】

ある実施形態においては、エピトープは、アミノ酸配列ＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶ（配列番号７）、ＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲ（配列番号８）及びＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧＧＫＫＲ（配列番号９）、及び／又はＡＰＰＬ１タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域の１つ以上を含む。

【０２０２】

ある実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチド（又はタンパク質）は、単離ポリペプチドである。ある実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチド（又はタンパク質）は、精製ポリペプチドである。ある実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチド（又はタンパク質）は、非天然ポリペプチドである。ある実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチド（又はタンパク質）は、組換えポリペプチドである。ある実施形態においては、本明細書に記載のポリペプチド（又はタンパク質）は、合成ポリペプチドである。別のタイプのポリペプチドも企図される。

【０２０３】

ポリペプチド又はアミノ酸配列の「変異体」という用語は、例えば、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸欠失変異体、アミノ酸置換変異体、及びアミノ酸修飾変異体（天然及び／又は合成）の１つ以上を含む。

【０２０４】

例えば、アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列における（任意の所望の長さの）アミノ及び／又はカルボキシ末端融合、及び単一又は２個以上のアミノ酸の挿入も含むことができる。挿入を含むアミノ酸配列変異体の場合、１個以上のアミノ酸残基をアミノ酸配列内の特定の部位に挿入することができるが、得られる産物の適切なスクリーニングを含む無作為な挿入も可能である。

【０２０５】

アミノ酸欠失変異体は、配列からの１個以上のアミノ酸の除去を特徴とする。アミノ酸置換変異体は、配列内の少なくとも１個の残基が除去され、別の残基がその場所に挿入されることを特徴とする。

【０２０６】

変異体におけるアミノ酸変化は、非保存的及び／又は保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に帯電したアミノ酸、又は無電荷アミノ酸の置換とすることができる。保存的アミノ酸変化は、その側鎖に関連したアミノ酸の族の１つの置換を含む。天然アミノ酸は、一般に、４つの族に分割される：酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、及び無電荷極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、シスチン、セリン、スレオニン、チロシン）アミノ酸。フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンは、時折、芳香族アミノ酸として一緒に分類される。

【０２０７】

本明細書に記載のポリペプチド及びアミノ酸変異体は、公知のペプチド合成技術の助けで、例えば、固相合成及び同様の方法によって、又は組換えＤＮＡ操作によって、容易に

調製することができる。置換、挿入又は欠失を含むタンパク質及びペプチドを調製するＤＮＡ配列の操作は、参照により本明細書に援用する、サムブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ），Ｊ、フリッチュ（Ｆｒｉｔｓｃｈ），Ｅ．Ｆ．及びマニアチス（Ｍａｎｉａｔｉｓ），Ｔ．「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）」第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）、ニューヨーク（１９８９）、及び参照により本明細書に援用する、アウスベル（Ａｕｓｕｂｅｌ）ら「分子生物学の最新手順（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）」（２０１１）、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ）に詳述されている。

【０２０８】

「誘導体」という用語は、種の改変体を指す。例えば、ポリペプチド又はタンパク質の誘導体とは、ポリペプチド又はタンパク質の改変体を指す。かかる改変としては、化学修飾が挙げられ、炭水化物、脂質及び／又はタンパク質若しくはペプチドなどのタンパク質又はペプチドに関連する任意の分子の単一又は複数の置換、欠失及び／又は付加を含む。「誘導体」という用語は、前記タンパク質及びペプチドのすべての機能的化学的等価物にも及ぶ。

【０２０９】

ポリペプチド及びタンパク質を単離及び／又は製造する方法は公知であり、参照により本明細書に援用する、サムブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ），Ｊ、フリッチュ（Ｆｒｉｔｓｃｈ），Ｅ．Ｆ．及びマニアチス（Ｍａｎｉａｔｉｓ），Ｔ．「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）」第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）、ニューヨーク（１９８９）、及び参照により本明細書に援用する、アウスベル（Ａｕｓｕｂｅｌ）ら「分子生物学の最新手順（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）」（２０１１）、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ）に概説されている。

【０２１０】

本開示のある実施形態は、ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離及び／又は精製抗体を提供する。本開示のある実施形態は、前記アミノ酸配列の１つ以上からなるポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【０２１１】

ある実施形態においては、抗体は、ＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮ（配列番号１０）、ＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲ（配列番号１１）及びＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲ（配列番号１２）の１つ以上のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対して産生される。本開示のある実施形態は、前記アミノ酸配列の１つ以上からなるポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【０２１２】

本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦ　ＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡ　ＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）、ＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮ（配列番号１０）、ＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲ（配列番号１１

）及びＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲ（配列番号１２）、前記アミノ配列のいずれかの断片、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体の１つ以上からなるポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。

【０２１３】

本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦ　ＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡ　ＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）、ＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮ（配列番号１０）、ＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲ（配列番号１１）及びＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲ（配列番号１２）、前記アミノ配列のいずれかの断片、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体の１つ以上を含む非天然ポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。

【０２１４】

本開示のある実施形態は、ＰＮＴＦＫＴＬＤＳＷＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩ（配列番号４）、ＤＰＥＮＦＰＦＶＶＬＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲＡＱＡＷＣＹＳＫＮＮ（配列番号５）、ＡＬＫＱＥＴＥＶＥＬＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲＡＫＡＳＡＥＳＣＳＣ（配列番号６）の１つ以上を含むヒトＲＡＢ７タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体を提供する。

【０２１５】

ある実施形態においては、エピトープは、アミノ酸配列ＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮ（配列番号１０）、ＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲ（配列番号１１）及びＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲ（配列番号１２）及び／又はＲＡＢ７タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域の１つ以上を含む。

【０２１６】

本開示のある実施形態は、ＣＫＫＬＤＤＦＶＥＴＧＤＩＲＴＭＶＦＰ（配列番号１３）のアミノ酸配列、前記アミノ酸配列のいずれかの抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列のいずれか若しくはその抗原性断片の変異体を含むポリペプチドに対する単離及び／又は精製抗体を提供する。本開示のある実施形態は、前記アミノ酸配列からなるポリペプチドに対する単離若しくは精製抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【０２１７】

本開示のある実施形態は、ＣＫＫＬＤＤＦＶＥＴＧＤＩＲＴＭＶＦＰ（配列番号１３）を含むヒトＬＩＭＰ－２タンパク質中のアミノ酸配列におけるエピトープ、及び／又は前記タンパク質のホモログ、オルソログ若しくはパラログの等価な領域に結合した単離及び／又は精製抗体を提供する。

【０２１８】

本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＣＫＫＬＤＤＦＶＥＴＧＤＩＲＴＭＶＦＰ（配列番号１３）、前記アミノ配列の断片、前記アミノ酸配列の抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列若しくはその抗原性断片の変異体からなるポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。

【０２１９】

本開示のある実施形態は、以下のアミノ酸配列：ＣＫＫＬＤＤＦＶＥＴＧＤＩＲＴＭＶＦＰ（配列番号１３）、前記アミノ配列の断片、前記アミノ酸配列の抗原性断片、及び／又は前記アミノ酸配列若しくはその抗原性断片の変異体を含む非天然ポリペプチドを提供する。かかるポリペプチドを、例えば、抗体産生に使用することができる。

【０２２０】

本開示のある実施形態は、ＡＰＰＬ１タンパク質又はその断片を検出する方法であって、本明細書に記載の抗体を使用するステップを含む方法を提供する。

【０２２１】
本開示のある実施形態は、ＲＡＢ７タンパク質又はその断片を検出する方法であって、本明細書に記載の抗体を使用するステップを含む方法を提供する。
【０２２２】
本開示のある実施形態は、ＬＩＭＰ２タンパク質又はその断片を検出する方法であって、本明細書に記載の抗体を使用するステップを含む方法を提供する。
【０２２３】
本開示のある実施形態は、対象における前立腺癌を検出する方法であって、本明細書に記載の抗体を使用して、ＡＰＰＬ１、ＲＡＢ７若しくはＬＩＭＰ２タンパク質、及び／又はその断片、誘導体若しくは加工体を対象から検出するステップを含む方法を提供する。
【０２２４】
本開示のある実施形態は、本明細書に記載の抗体を含むキットを提供する。キットは、本明細書に記載の１種以上の別の試薬を含むことができる。
【０２２５】
本開示のある実施形態は、本明細書に記載の抗体を産生するハイブリドーマを提供する。ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体を製造する方法は当該技術分野で公知である。
【０２２６】
典型的なハイブリドーマ製造手順は、以下の通りである。まず、動物（例えば、マウス）を選択された抗原に暴露する。通常、これは、数週間にわたる一連の抗原注入によってなされる。ひ細胞をほ乳動物のひ臓から単離すると、Ｂ細胞を不死化骨髄腫細胞と融合させることができる。一般に、骨髄腫細胞は、確実に、それらが抗体を自ら分泌せず、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ：ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ－ｇｕａｎｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ）遺伝子がないためにＨＡＴ培地に感受性となるように、選択される。融合は、例えば、ポリエチレングリコール又はセンダイウイルスを使用して、実施することができる。
【０２２７】
融合細胞をＨＡＴ培地中で約１０から１４日間インキュベートする。アミノプテリンは、ヌクレオチド合成を可能にする経路を遮断する。非融合骨髄腫細胞は、ＨＧＰＲＴを含まないので、新生経路でもサルベージ経路でもヌクレオチドを産生することができずに死滅する。非融合骨髄腫細胞は、別の細胞、特に弱く樹立されたハイブリドーマを増殖させる可能性があるので、除去する必要がある。非融合Ｂ細胞は、寿命が短いので死滅する。このようにして、Ｂ細胞由来のＨＧＰＲＴ遺伝子は機能的であるので、Ｂ細胞－骨髄腫ハイブリッドのみが生存する。これらの細胞は、抗体を産生し、不死である。次いで、各ウェルが１個の細胞のみを含むようにインキュベート培地をマルチウェルプレート中に希釈する。ウェル中の抗体は同じＢ細胞によって産生されるので、同じエピトープを対象とし、したがってモノクローナル抗体である。
【０２２８】
次の段階は、迅速な一次スクリーニングプロセスであり、適切な特異性の抗体を産生するハイブリドーマのみを特定し、選択する。次いで、ハイブリドーマ培養上清、二次酵素標識複合物、及び色素生産性又は蛍光性基質をインキュベートする。有色産物の形成は、陽性ハイブリドーマを示す。あるいは、免疫細胞化学的スクリーニング又はフローサイトメトリーを使用することもできる。
【０２２９】
所望の抗体を産生するＢ細胞をクローン化して、多数の同一の娘クローンを産生することができる。インターロイキン６を含む補充培地がこのステップに不可欠である。ハイブリドーマコロニーが樹立されると、（抗生物質及びウシ胎仔血清を含む）ＲＰＭＩ－１６４０のような培地中で連続して増殖し、抗体を産生する。
【０２３０】
マルチウェルプレートを最初に使用して、ハイブリドーマを増殖させ、選択後に、より大きい組織培養フラスコに替える。これによって、ハイブリドーマの満足な状態を維持し

、それに続く調査のために凍結保存に十分な細胞及び上清が得られる。培養上清は、モノクローナル抗体１から６０μｇ／ｍｌを生成することができる。モノクローナル抗体は、必要になるまで－２０℃以下で維持される。

【０２３１】

培養上清又は精製免疫グロブリン調製物を使用することによって、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ候補の更なる分析を反応性、特異性及び交差反応性に関して実施することができる。

【０２３２】

最後に、標準技術を組換えＤＮＡ技術、オリゴヌクレオチド合成、抗体産生、ペプチド合成、組織培養及び移入に使用することができる。酵素反応及び精製技術は、製造者の仕様書に従って、又は当該技術分野で一般に実施される通りに、又は本明細書に記載の通りに、実施することができる。上記技術及び手順は、一般に、当該技術分野で公知の従来法によって実施することができ、本明細書を通して引用及び考察する様々な一般的参考文献及びより具体的な参考文献に記載のように実施することができる。例えば、参照により本明細書に援用する、サムブルーク（Ｓａｍｂｒｏｏｋ）ら「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）」（第二版、コールドスプリングハーバー研究所出版（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（１９８９））を参照されたい。

【０２３３】

例示的実施形態を以下の実施例によって説明する。以下の記述は、特定の実施形態を記述するためのものにすぎず、その記述に関して限定的であることを意図するものではないことを理解されたい。

【実施例】

【０２３４】

実施例１－前立腺癌におけるエンドソーム生合成の変化

材料及び方法

（ｉ）試薬

ＬＩＭＰ－２ヒツジポリクローナル抗体をペプチド配列ＣＫＫＬＤＤＦＶＥＴＧＤＩＲＴＭＶＦＰ（配列番号１３）（Ｍｉｍｏｔｏｐｅｓ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて生成した。この試験に用いた一次抗体は、ＡＰＰＬ１（０．４μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ　ＰＬＣ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ、カタログ番号ａｂ９５１９５）、ＡＰＰＬ２（０．４μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ９５１９６）、Ｒａｂ４（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ１３２５２）、ＴＧＮ４６（１０μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ５０５９５）、ＴｆＲ１（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ１０８９８５）、ＴｆＲ２（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ８０１９４）、Ａｋｔ（１／１０００，Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．、ＭＡ、ＵＳＡ）及びホスホ－Ａｋｔ（Ｔｈｒ３０８　１／１０００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．）に対するウサギポリクローナル抗体などであった。ヤギ抗Ｒａｂ５（１μｇ／ｍＬ、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＣＡ、ＵＳＡ）、Ｒａｂ７（１μｇ／ｍＬ、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）及びＥＥＡ１（１μｇ／ｍＬ、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）ポリクローナル抗体も使用した。ＬＡＭＰ－１（１μｇ／ｍＬ）マウスモノクローナルＢＢ６は、ウメオ大学、スウェーデンから提供された）。ウエスタンブロット分析用ＨＲＰ複合二次抗体は、抗ヤギ／ヒツジ（１／２０００、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）、抗ウサギ（１／２０００、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）及び抗マウス（１／２０００　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．）などであった。ＨＲＰ複合抗ＧＡＰＤＨ（１／２０００００　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ

．）。用いた二次及び他の抗体複合蛍光団は、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア製Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８（１／２５０）、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３（１／２５０）、トランスフェリン６３３（１／１０００）、ファロイジン４８８（１／１００）、ＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）（５μＭ）などであった。プライマーをＧｅｎｅｗｏｒｋｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、アデレード、オーストラリアから得た。その配列を支持情報表１に列挙した。

【０２３５】

（ｉｉ）細胞株及び培養条件

細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ（クローンＦＣＧ）を細胞バンクオーストラリア（ＣｅｌｌＢａｎｋ Ａｕｓｔｒａｌｉａ）（小児医学研究所（Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を介して欧州細胞培養コレクション（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ）から得た。これらの細胞株は、交差汚染又は誤認細胞株のリスト、バージョン６．８（２０１２年３月９日）にはなかった。ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２をサル空胞形成ウイルス４０（ＳＶ４０）不死化細胞株から前もって誘導した。２２ＲＶ１癌細胞株を異種移植片から前もって誘導した。異種移植片は、去勢によって誘導された親のアンドロゲン依存性異種移植片の退行及び再発後にマウスにおいて連続的に増殖されたものである。この細胞株は、アンドロゲン受容体を発現したが、その増殖は、アンドロゲン刺激に反応しなかった。ＬＮＣａＰは、前立腺腺癌のリンパ節転移から前もって誘導され、アンドロゲンに反応する。

【０２３６】

細胞株をＴ７５組織培養フラスコ中で培養し、１０％ウシ胎仔血清（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）及び２ｍＭ Ｌ－グルタミン（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を補充したロズウェルパーク記念研究所（ＲＰＭＩ：Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）中で維持した。Ｓａｎｙｏ ＭＣＯ－１７ＡＩ加湿恒温器（Ｓａｎｙｏ Ｅｌｅｃｔｒｉｃ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．、大阪、日本）中で５％CO_2と一緒に細胞を３７℃でインキュベートした。約９０％コンフルエントの細胞を無菌ＰＢＳ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）で洗浄し、培養表面から分離するためにトリプシン処理し（０．１２％トリプシン、０．０２％ＥＤＴＡを含有するトリプシン－ＥＤＴＡ溶液；ＳＡＦＣ（登録商標）、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）、次いで補足培地に懸濁させて継代した。

【０２３７】

（ｉｉｉ）細胞抽出物調製

培地を８０～９０％コンフルエントな細胞培養物から吸引し、細胞をＰＢＳで１回洗浄し、次いで８００μＬの２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．０）、５００ｍＭ塩化ナトリウム及び２％ＳＤＳ溶液と一緒にインキュベートした。細胞を収集し、６５℃に加熱し、１分間超音波処理して抽出物を調製した。次いで、溶解物を２５ゲージ針に６回通した。細胞抽出物中の総タンパク質量を製造者の指示に従ってビシンコニン酸アッセイにより定量化した（Ｍｉｃｒｏ ＢＣＡキット、Ｐｉｅｒｃｅ、ロックフォード、ＩＬ、ＵＳＡ）。Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ（商標）光学プレートリーダー及びＷｏｒｋｏｕｔソフトウェアｖ２．０（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｐｔｙ，Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）、５点パラメータ検量線を用いて試料を定量化した。細胞抽出物を－２０℃で貯蔵した。

【０２３８】

（ｉｖ）遺伝子発現解析

細胞株を８０～９０％コンフルエントに培養し（３つ組Ｔ７５フラスコ）、培地を吸引

し、細胞層をＰＢＳで洗浄し、その後、１ｍＬのＴＲＩ試薬（登録商標）（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を添加して、収集した。ＴＲＩ試薬（登録商標）１ミリリットル当たり２００マイクロリットルのクロロホルムを添加し、試料を１分間激しく振とうし、室温で３分間インキュベートし、次いで１６，０００ｇ、４℃で１５分間遠心分離した。ＲＮＡ抽出をＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて製造者の指示に従って実施した。抽出ＲＮＡの濃度をＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて２６０ｎｍで測定した。２６０／２８０ｎｍ及び２６０／２３０ｎｍの各比を測定して、試料にタンパク質及びＤＮＡ混入がないことを確認した。１．６より大きい比は、試料が汚染されていないことを示す。

【０２３９】

ｑＲＴ－ＰＣＲ用の相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）をＨｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡキット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて調製した。プライマー配列を文献、Ｈａｒｖａｒｄ ＰｒｉｍｅｒＢａｎｋから得た、又はＮＣＢＩ Ｐｒｉｍｅｒ－ＢＬＡＳＴを用いて設計した。最終アンプリコンサイズが１５０塩基対未満であり、融解温度が約６０℃であり、可能であれば、エキソン－エキソン接合部にわたる範囲であるという判定基準に基づいてプライマーを選択又は設計した。定量的ＲＴ－ＰＣＲのために、反応混合物１０μＬは、５μＬのＰｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）、各０．５μＬの１０ｎＭ順方向及び逆方向プライマー、ＤＥＰＣ処理H_2Oで１：２５希釈されたｃＤＮＡ試料２μＬ、並びにＤＥＰＣ処理H_2O２μＬを含んだ。反応物を３つ組で９６ウェルプレート（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）上で培養した。各プレートは、反応効率を制御するために、標的遺伝子と内在性遺伝子の検量線のための基準ｃＤＮＡ試料の段階希釈物を含んだ。７５００Ｆａｓｔ Ｒｅａｌ－ＴｉｍｅＰＣＲシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）とＡＢＩ７５００ソフトウェアｖ２．０．２を用いてｑＰＣＲを実施した。

【０２４０】

すべての標的のサイクリング条件は、酵素を活性化し、ｃＤＮＡを変性させるために５０℃で２分間、９５℃で１０分間、続いて９５℃で１５秒の変性ステップと６０℃で６０秒の伸長及び信号取得ステップを４０サイクルであった。サイクルしきい値（C_T：ｃｙｃｌｅ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を増殖の対数期におけるしきい値レベル０．３５で、かつベースラインノイズよりも上にした。各試料からの遺伝子発現の相対量を、段階希釈物から作成された検量線に対するC_T値の計算によって導出した。希釈標準からプロットした傾向直線の傾きから計算した反応効率は、９０から１１０％であった。平均遺伝子発現量を各複製プレート上のｍＲＮＡ量から導出した。各単一のプレートは、複製ウェルからの平均C_T及びｍＲＮＡレベルを与えた。

【０２４１】

（ｖ）ウエスタンブロット法

細胞溶解物１０μｇを加熱変性し（ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）ＬＤＳ試料緩衝剤及び還元剤中で１００℃で５分間）、次いで前もって成形されたゲルを用いて、ＸＣｅｌｌ ＳｕｒｅＬｏｃｋ Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）において１２０Ｖで１．５時間電気泳動させた。次いで、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜（Ｐｏｌｙｓｃｒｅｅｎ（登録商標）、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ビクトリア、オーストラリア）に３５Ｖで１時間移した。転写膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎ（０．１％；ブロック）中の５％

（ｗ／ｖ）脱脂乳溶液を用いて室温で１時間ブロックし、一次抗体と一緒に４℃で終夜インキュベートした。膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎ（０．１％）で３×５分間洗浄し、次いでブロック溶液で１／２０００希釈した適切なセイヨウワサビ－ペルオキシダーゼ複合二次抗体と一緒にインキュベートした。Ｎｏｖｅｘ（登録商標）ＥＣＬ化学発光基質試薬キット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて膜を現像し、ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ（商標）ＬＡＳ４０００画像装置、ソフトウェアバージョン１．２．０．１０１（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を用いてタンパク質を可視化した。３つ組試料を分析し、ＡｌｐｈａＶｉｅｗＳＡ（商標）ソフトウェアｖ３．０．０．０（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ、サンタクララ、カリフォルニア）を用いて基準ＧＡＰＤＨ添加コントロールに対して画像を定量化した。Ｓｔａｔａ／ＳＥ ｖ１１．２（ＳｔａｔａＣｏｒｐ ＬＰ、テキサス、米国）を用いたクラスカル ワリス順位和統計分析を実施して、非悪性コントロール細胞株群と癌細胞株群の間の有意性を求めた（９５％信頼限界；ｐ＜０．０５）。

【０２４２】

（ｖｉ）共焦点顕微鏡法

細胞を２２ｍｍカバーガラス上で培養し、ＰＢＳ中の４％（ｖ／ｖ）ホルムアルデヒドを用いて室温で２０分間固定し、次いでＰＢＳ中の０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ（ｖ／ｖ）で１０分間透過処理した。ＰＢＳ中の５％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミンと一緒に室温で２時間インキュベートすることによって非特異抗体の反応性をブロックした。次いで、細胞を５％ＢＳＡ中で一次抗体と一緒に室温で２時間、次いで二次抗体と一緒に室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで３回洗浄して結合していない抗体を除去し、カバーガラスをＤＡＰＩ核染料を含むＰｒｏＬｏｎｇ（登録商標）Ｇｏｌｄ Ａｎｔｉｆａｄｅ試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）中に置いた。共焦点顕微鏡法をＺｅｉｓｓ ＬＳＭ７１０ＭＥＴＡ ＮＬＯレーザー走査顕微鏡及び付属のＣａｒｌ Ｚｅｉｓｓ Ｚｅｎ２００９ソフトウェアを用いて実施した。３７０、４８８、５４３及び６３３ｎｍのレーザー線をそれぞれＤＡＰＩ、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８、Ｃｙ３及びＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３蛍光に利用した。画像をグレースケール１６ビットＴＩＦＦファイルとしてエクスポートし、Ａｄｏｂｅ（登録商標）Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐ（登録商標）ＣＳ５（Ａｄｏｂｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．、サンホゼ、カリフォルニア、米国）を用いて処理した。

【０２４３】

（ｖｉｉ）免疫組織化学

対応ヒト非悪性及び腫よう前立腺組織切片（３μｍ）をＳｕｐｅｒｆｒｏｓｔ Ｕｌｔｒａ Ｐｌｕｓ（登録商標）スライド（Ｍｅｎｚｅｌ－Ｇｌａｓｅｒ）に載せ、５０℃で終夜加熱した。次いで、切片をキシレンで脱脂し、エタノール中で再水和させ、ＰＢＳ中の０．３％H_2O_2中で室温で１５分間インキュベートした。抗原賦活化装置（Ｄｅｃｌｏａｋｉｎｇ Ｃｈａｍｂｅｒ）（Ｂｉｏｃａｒｅ Ｍｅｄｉｃａｌ）中で１０ｍＭクエン酸緩衝剤（ｐＨ６．５）を用いて１２５℃で５分間ＨＩＥＲを実施した。スライドをまず（製造者の指示に従って）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎアビジン／ビオチンキットを用いてブロックし、次いで高湿度チャンバ内の５％ブロッキング血清（ＳＩＧＭＡ）中で室温で３０分間ブロックした。次いで、切片を高湿度チャンバ内で一次抗体と一緒に４℃で終夜インキュベートし、続いて高湿度チャンバ内で適切なビオチン化二次抗体（１／４００；ＤＡＫＯ）と一緒に室温で１時間インキュベートし、次いで高湿度チャンバ内で室温で１時間ストレプトアビジン－セイヨウワサビ過酸化物化し（１／５００；ＤＡＫＯ）、最後にＤＡＢ／H_2O_2と一緒にインキュベートした。次いで、組織切片をＬｉｌｌｉｅ－Ｍａｙｅｒヘマトキシリンで対比染色し、水洗し、再水和し、ＤＰＸと一緒にスライドに載せた。Ｎａｎｏｚｏｏｍｅｒ（Ｈａｍａｍａｔｓｕ）を用いてスライドを走査して画像を得た。

【０２４４】
結果
（ｉ）前立腺癌細胞におけるエンドソーム関連遺伝子及びタンパク質発現の増加
エンドソーム及びリソソーム関連遺伝子の発現をコントロール及び前立腺癌細胞におけるｑＲＴ－ＰＣＲによって定量化し、ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡの発現に対して規格化した。ＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２、ＥＥＡ１、ＲＡＢ５Ａ、ＲＡＢ４Ａ及びＬＩＭＰ２　ｍＲＮＡ量は、非悪性コントロール細胞株よりも前立腺癌で有意に増加した（ｐ＜０．０５；図１）。各場合において、ｍＲＮＡ発現が約２～３倍増加した。前立腺癌細胞において検出されたＲＡＢ７Ａ又はＬＡＭＰ１　ｍＲＮＡの量は非悪性コントロールに比べて有意差がなかった。ウエスタン分析によれば、前立腺癌細胞由来の抽出物におけるＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２、ＥＥＡ１、Ｒａｂ４及びＬＩＭＰ－２タンパク質量が非悪性コントロール細胞に比べて有意に増加した（ｐ＜０．０５；図２）。さらに、ＬＩＭＰ－２とＲａｂ４の両方で、前立腺癌での増加は、非悪性コントロール細胞の約２～４倍であった（図２）。非悪性細胞において検出されたＲａｂ５Ａ、Ｒａｂ７及びＬＡＭＰ－１タンパク質量は前立腺癌細胞に比べて有意差がなかった（図２）。

【０２４５】
（ｉｉ）前立腺癌細胞におけるエンドソーム及びリソソームの分布の変化
エンドソーム及びリソソームの分布の代表的な共焦点像（図３）は、非悪性コントロールに比べて前立腺癌において染色が増加し、区画分布が変化した。ＡＰＰＬ１陽性エンドソームは、非悪性コントロール細胞の核周囲領域で主に検出されたが、前立腺癌細胞においてはこれらの区画は細胞周辺に向かって分布し、細胞伸長部／仮足において原形質膜近くでより濃縮される傾向にあった。Ｒａｂ５Ａは、非悪性コントロール細胞と前立腺癌細胞の両方においてそのエフェクターＥＥＡ１に類似した分布を示した。しかし、非悪性コントロール細胞においてはＲａｂ５ＡとＥＥＡ１の両方が核周囲領域で濃縮されたが、前立腺癌細胞においてはこれらのエンドソーム区画は細胞質全体に見られ、一部の区画は細胞伸長部における細胞周辺に向かって位置した。Ｒａｂ７陽性エンドソームは、主に、非悪性コントロール細胞と前立腺癌細胞の両方の核周囲領域に位置した。非悪性コントロール細胞においては、ＬＩＭＰ－２は、核周囲領域で濃縮され、細胞質の残部において、さらに細胞表面近くで、幾らかの管状及び点状（ｐｕｎｃｔｕａｔｅ）小胞染色があった。それに対して、前立腺癌細胞は、細胞質全体に均一に分布した比較的小さいＬＩＭＰ－２区画を示した。非悪性コントロール細胞においては、ＬＡＭＰ－１は、核周囲領域で高濃度である区画上で検出されたが、前立腺癌細胞においては、ＬＡＭＰ－１区画は、核周囲領域から離れて分布し、細胞伸長部で高濃度であった。ＬＡＭＰ－１染色と一致して、ＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（商標）陽性酸性区画は、主に非悪性コントロール細胞の核周囲領域において高濃度であったが、前立腺癌細胞においては、これらの区画は、核周囲領域と細胞質伸長部の両方で検出された（図４）。

【０２４６】
（ｉｉｉ）前立腺癌細胞におけるエンドサイトーシスによって取り込まれたトランスフェリンの分布の変化
以前の研究は、前立腺癌細胞におけるトランスフェリン取り込みの増加を報告し、エンドソームタンパク質発現の増加及びエンドソーム分布の変化が認められたことに関連して受容体発現及びトランスフェリンエンドサイトーシスの調査を促した。非悪性コントロール細胞においては、エンドサイトーシスによって取り込まれたトランスフェリンが、５分後に点状細胞内構造に認められ、１５及び３０分で核周囲領域に認められた（図５）。前立腺癌細胞は、非悪性コントロール細胞株よりも多量のトランスフェリンをエンドサイトーシスによって取り込み、内部に取り込まれたトランスフェリンは、非悪性コントロールに比べて、前立腺癌細胞の核周囲領域に濃縮されず、細胞周辺に多い（図５）。前立腺癌では、非悪性コントロール細胞株に比べてアクチン染色も劇的に減少した（図５）。非悪性コントロール細胞においては、トランスフェリンは、核周囲領域に局在するＬＩＭＰ－２及びＲａｂ７陽性エンドソームにおいてクラスターを形成した（図６）。前立腺癌細胞

は、核周囲領域において幾らかのＬＩＭＰ－２陽性染色を示し、ゴルジマーカーＴＧＮ４６と幾らか共存したが、トランスフェリンの大部分は、細胞質全体及び細胞伸長部に分布した異なるエンドソーム区画（すなわちＡｐｐｌ１、Ｒａｂ５Ａ、ＥＥＡ１）に局在した（図６）。Ｒａｂ４リサイクリングエンドソーム及びＬＡＭＰ－１陽性リソソームは、前立腺癌細胞株と非悪性コントロール細胞株で類似したトランスフェリン染色パターンを示した（図６）。トランスフェリン受容体の更なる分析によって、ＴｆＲ１及びＴｆＲ２で遺伝子及びタンパク質の発現が変わりやすいことが明らかになった（図７）。前立腺癌細胞におけるＴＦＲ１遺伝子発現は非悪性コントロールに比べて有意に増加したが、前立腺癌細胞株２２ＲＶ１ではＴＦＲ１タンパク質は定性的にしか増加せず、ＬＮＣａＰでは増加しなかった（図７Ａ）。前立腺癌細胞において検出されたＴＦＲ２タンパク質は非悪性コントロールに比べて有意に増加したが、ＴＦＲ２遺伝子発現の増加はＬＮＣａＰでしか認められなかった（図７Ａ）。したがって、前立腺癌におけるＴＦＲタンパク質量は非悪性コントロール細胞に比べて増加したが、２２ＲＶ１におけるＴＦＲ１及びＬＮＣａＰ細胞におけるＴＦＲ２が比較的多かった。

【０２４７】

（ｉｖ）前立腺癌細胞におけるＡｋｔシグナル伝達の変化

非悪性コントロール細胞において検出されたＡｋｔタンパク質総量は、前立腺癌細胞において検出されたものと同様であった（図８）。しかし、前立腺癌株におけるリン酸化Ａｋｔ量は異なり、２２ＲＶ１はリン酸化Ａｋｔ量が著しく減少したのに対して、ＬＮＣａＰはリン酸化Ａｋｔ量が増加した（図８）。より重要なことには、トランスフェリンの添加後、非悪性コントロール細胞におけるリン酸化Ａｋｔ量は有意に増加したが、どの癌細胞においてもリン酸化Ａｋｔ量が変化しなかった（図８Ｂ）。興味深いことに、（トランスフェリンで処理されなかった）ＬＮＣａＰ細胞において認められたリン酸化Ａｋｔ量の増加は、この細胞株において検出されたＴｆＲ２量と相関した（図７Ａ及び図８）。

【０２４８】

（ｖ）非悪性及び悪性ヒト前立腺組織におけるＬＡＭＰ－１及びＡＰＰＬ１の分布

免疫組織化学を利用して、前立腺癌患者組織試料におけるＬＡＭＰ－１及びＡＰＰＬ１の分布を調べた。リソソームマーカーＬＡＭＰ－１は、一部の患者試料において幾らかの腫よう特異的染色を示したが（図９）、以前の研究と一致して、結果が変動し、一部の患者試料は、ほとんど又は全くＬＡＭＰ－１染色を示さなかった（データ示さず）。しかし、ＡＰＰＬ１は、癌周縁部を特異的に描出し、腫りゅう内の染色が劇的に増加した（図９）。このＡＰＰＬ１染色パターンは、調べた６個の異なる患者試料の各々で一致した。

【０２４９】

考察

前立腺癌は、男性において最も頻繁に診断された癌のひとつであり、世界的な、特に米国及びオーストラレーシア人において癌関連死の一主要原因である。前立腺特異抗原は、依然として前立腺癌を検出するのに一般に使用される試験であるが、誤診及び予後予測の点で重大な問題がある。前立腺癌抗原３（ＰＣＡ３：ｐｒｏｓｔａｔｅ ｃａｎｃｅｒ ａｎｔｉｇｅｎ ３）、コレステロール硫酸の分析、及びタンパク質プロテインキナーゼＣ－ζ（ＰＲＫＣＺ（ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ Ｃ－ｚｅｔａ））－$_{PrC}$に翻訳される遺伝子プロテインキナーゼＣ－ゼータの新規配列を含めて、幾つかの有望な補助試験が最近開発された。しかし、これらのバイオマーカーは、適切な治療的介入を可能にする前立腺癌の早期の正確な検出のための有用な方法を与えない幾つかの欠点がある。

【０２５０】

新しい前立腺癌バイオマーカー候補を描く広範なタンパク質及びプロテオミクス研究がなされたが、それにもかかわらず、適切なマーカーはまだ特定されていない。

【０２５１】

今回、本発明者らは、前立腺癌細胞の細胞周辺へのエンドソーム及びリソソーム小胞の分布の変化を認めた。Na^+／H^+交換活性（酸性化）、ＲｈｏＡ ＧＴＰアーゼ活性及びＰＩ３Ｋ活性化の増大は、前立腺癌細胞からのエキソサイトーシスを招くことが示され

た。エンドソーム関連遺伝子及びタンパク質の発現の増加は、エンドソーム関連タンパク質が前立腺癌疾患マーカー研究の重要な新しい焦点になり得ることを示唆している。

【０２５２】

本発明者らは、前立腺癌細胞株におけるエンドソームタンパク質ＬＩＭＰ－２の遺伝子及びタンパク質の発現の増加を認め、前立腺癌細胞におけるエンドソーム生合成を調べることにした。初期エンドソーム関連タンパク質ＥＥＡ１、ＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２及びリサイクリングエンドソームタンパク質Ｒａｂ４は、前立腺癌細胞において有意に上方制御され、前立腺癌においてエンドソーム生合成が変化するという仮説を支持する。さらに、ＥＥＡ１、ＡＰＰＬ１及びＡＰＰＬ２エンドソーム亜集団は各々、エンドソーム輸送及び場合によってはエンドソーム機能の変化と一致した細胞内分布の変化を示した。

【０２５３】

エンドソーム集団の分布の変化と一緒に、本発明者らがエンドソーム関連遺伝子及びタンパク質の発現に認めた有意な変化は、エンドソーム機能の尺度としてのトランスフェリンエンドサイトーシス、選別及びＡｋｔシグナル伝達と一緒にトランスフェリン受容体発現を調べる誘因になった。Ａｋｔシグナル伝達は、細胞増殖及び生存の調節にも不可欠であり、トランスフェリン及び成長因子受容体の細胞表面発現を制御する。トランスフェリン受容体は、Ｒａｂ５及びモータータンパク質ミオシンＶＩと共存することが以前に認められ、後者は、原形質膜への逆行輸送に関与する。これは、エンドソーム集団が前立腺癌細胞の細胞周辺において標識トランスフェリンと共染色される本発明者らの観察と一致した。前立腺癌細胞においてＡｋｔシグナル伝達の調節解除も存在すると考えられる。これは、トランスフェリン受容体の細胞内位置を変え、ＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２及びＲａｂ５エンドソームの異なる集団中にそれを送ることができる。

【０２５４】

ＡＰＰＬ１は、インスリンシグナル伝達に、また、ＡＰＰＬ１とＰＩ３Ｋ及びＡｋｔとの直接結合によって媒介されるグルコース輸送体ＧＬＵＴ－４の転位に、直接関与することが示された。本発明者らが前立腺癌細胞において認めたＡＰＰＬ１の遺伝子及びタンパク質の発現の増加は、ＧＬＵＴ－４に対するその効果のためにグルコース取り込みを増加させると予想される。これは、これらの癌細胞におけるエネルギー代謝に密接な関係を有すると考えられる。実際、ＡＰＰＬ１は、脂質と糖代謝の両方の別の側面も調節し、ＡＭＰ活性化キナーゼ、ｐ３８ＭＡＰキナーゼ（ＭＡＰＫ）及びＰＰＡＲαを活性化する。ＡＰＰＬ１に関係したＡＰＰＬ２は、アディポネクチン受容体との相互作用に対してＡＰＰＬ１との競合的結合によってアディポネクチンシグナル伝達の負の調節因子として機能し、やはりエネルギー代謝を調節することが示された。したがって、ＡＰＰＬ１とＡＰＰＬ２の両方の発現の増加は、特にこれらのタンパク質が一緒に観察されず、エンドソームの別々の集団で観察されるので、前立腺癌細胞代謝に大きく影響し得る。これは、エネルギー利用及び前立腺癌細胞生存の増加に直接的な意義を有し得る。前立腺癌細胞におけるＡＰＰＬ１発現及びＡｋｔシグナル伝達に対する効果の変化は、主要な細胞接着及び細胞遊走におけるＡＰＰＬ１／ＰＩ３Ｋ／Ａｋｔシグナル伝達経路の重要性のために、前立腺癌生物学の別の側面にも重大な結果をもたらすと予想される。特に、ＡＰＰＬ１は、ＡＰＰＬ１がエンドソーム輸送に直接関与する細胞表面又はエンドソーム経路における内在性タンパク質又は膜結合タンパク質のサイトゾル面との相互作用によって、別のシグナル伝達経路の媒介物質としても作用する。

【０２５５】

Ｒａｂ　ＧＴＰアーゼは、エンドソーム輸送、細胞質ＧＤＰ結合状態と活性膜結合ＧＴＰ結合状態の循環の制御に一体的に関与する。Ｒａｂ５及びＲａｂ７は、それぞれ、初期及び後期エンドソーム区画を規定し、エンドソーム成熟中に、Ｒａｂ５は、Ｒａｂ７を活性化し、Ｒａｂ７で置換される機構として、ＨＯＰＳ複合体を補充する。ｍＶｐｓ３９は、エンドソームＲａｂｓ上のＧＴＰ結合状態を促進するグアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ：ｇｕａｎｉｎｅ　ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｅｘｃｈａｎｇｅ　ｆａｃｔｏｒ）であることが知られており、ＴＢＣ－２／ＴＢＣ$_1$Ｄ$_2$は、ＧＤＰ結合状態を促進するＲａ

ｂ　ＧＴＰアーゼ活性化タンパク質（ＧＡＰ：ＧＴＰａｓｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）であり、Ｒａｂタンパク質の膜局在化を調節するのに併用される。ＴＢＣ－２／ＴＢＣ$_1$Ｄ$_2$は、エンドソームからリソソームへの輸送の制御因子として作用すると考えられ、エンドソームの正しいサイズ及び分布を維持するのに必要である。本発明者らが前立腺癌細胞中に認めたエンドソーム集団の分布の変化は、ＴＢＣ－２／ＴＢＣ$_1$Ｄ$_2$（ＧＡＰ）及び又はｍＶｐｓ３９（ＧＥＦ）が正常に機能しない恐れがあることを示唆している。興味深いことに、マイクロアレイ分析は、ＴＢＣ－２／ＴＢＣ$_1$Ｄ$_2$の発現の増加、及びＶｐｓ３９　ｍＲＮＡの減少を検出した。

【０２５６】

組織学的分化を規定するグリーソン分類システムをマーカー分析と併用して、前立腺癌患者における疾患の経過を予測する。本発明者らは、前立腺癌患者からの組織生検試料におけるＡＰＰＬ１タンパク質量の増加を認め、前立腺癌細胞株におけるＡＰＰＬ１の遺伝子及びタンパク質の発現の増加を確認した。

【０２５７】

本発明者らは、エンドサイトーシス及びトランスフェリン受容体再利用の変化に付随した、前立腺癌細胞における初期エンドソームマーカーの発現の増加並びにエンドソーム及びリソソーム区画の局在化の変化を示した。本発明者らは、エンドソーム生合成及び機能が前立腺癌細胞において変化すると結論し、前立腺癌の診断及び予知に役立つマーカーを開発するための研究の潜在的な新しい道を開いた。

【０２５８】

実施例２－前立腺癌バイオマーカー候補としてのリソソーム酵素

材料及び方法

（ｉ）抗体試薬

この試験で使用した一次抗体は、ｈＫ２（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ　ＰＬＣ、ケンブリッジ、英国、カタログ番号ａｂ４０９４８）、ｈＫ３（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ４０９４９）、ｈＫ４（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ４０９５０）、ｈＫ１５（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ４０９６１）、酸性セラミダーゼ（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ７４４６９）に対するウサギポリクローナル抗体などであった。前立腺酸性ホスファターゼ（１μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ７５７０４）、カテプシンＢ（０．２５μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ５８８０２）、カテプシンＤ（５μｇ／ｍＬ、Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ６３１３）に対するマウスモノクローナル抗体。αグルコシダーゼ（１μｇ／ｍＬ）、βグルコシダーゼ（１μｇ／ｍＬ）及びαガラクトシダーゼＡ（１μｇ／ｍＬ）に対するヒツジポリクローナル抗体は、リソソーム疾患研究ユニット（Ｌｙｓｏｓｏｍａｌ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｕｎｉｔ）（女性及び小児病院（Ｗｏｍｅｎ’ｓ　ａｎｄ　Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ）、ＳＡ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、アデレード、南オーストラリア）の好意で提供された。ＬＡＭＰ－１（１μｇ／ｍＬ）マウスモノクローナルＢＢ６は、ウメオ大学、ウメオ、スウェーデンの好意で提供された。ウエスタンブロット法用セイヨウワサビ－ペルオキシダーゼ（ＨＲＰ：ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ－ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ）複合二次抗体は、抗ヤギ／ヒツジ免疫グロブリン（１／２０００、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）、抗ウサギ免疫グロブリン（１／２０００、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）、抗マウス免疫グロブリン（１／２０００　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．）、ＨＲＰ複合抗ＧＡＰＤＨ（１／２００００　Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ．Ｌｔｄ．）などであった。

【０２５９】

（ｉｉ）細胞株及び培養条件

細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰクローンＦＣＧを細胞バンクオーストラリア（ＣｅｌｌＢａｎｋ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）（小児医学研究所（Ｃｈｉ

ｌｄｒｅｎ’ｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を介して欧州細胞培養コレクション（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ）から得た。細胞株ＲＷＰＥ－１、ＣａＨＰＶ１０及びＤＵ－１４５を、Ｃｒｙｏｓｉｔｅ（Ｃｒｙｏｓｉｔｅ Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を介してアメリカ培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から入手した。これらの細胞株は、交差汚染又は誤認細胞株のリスト、バージョン６．８（２０１２年３月９日）にはない。細胞株をＡＴＣＣ及びＥＣＣＣによって推奨された培地中で維持した。ＰＮＴ１ａ、ＰＮＴ２及び２２ＲＶ１細胞株を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ；ｆｅｔａｌ ｃａｌｆ ｓｅｒｕｍ、Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）及び２ｍＭ Ｌ－グルタミン（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を補充したロズウェルパーク記念研究所（ＲＰＭＩ：Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）中で培養した。ＲＷＰＥ－１及びＣａＨＰＶ１０細胞株を、供給されたヒト組換え上皮成長因子１－５３（ＥＧＦ１－５３）及びウシ下垂体抽出物（ＢＰＥ：ｂｏｖｉｎｅ ｐｉｔｕｉｔａｒｙ ｅｘｔｒａｃｔ）を補充した、Ｌ－グルタミンを含む角化細胞無血清培地（Ｋ－ＳＦＭ：Ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅ Ｓｅｒｕｍ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉａ）（Ｇｉｂｃｏ（登録商標））中で培養した。ＤＵ－１４５細胞株を最小必須培地（ＭＥＭ：ｍｉｎｉｍｕｍ ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｍｅｄｉｕｍ）（Ｇｉｂｃｏ（登録商標））中で培養し、２ｍＭ Ｌ－グルタミン及び１０％ＦＣＳを補充した。ＬＮＣａＰを、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１０％ＦＣＳ、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ及び１ｍＭピルビン酸ナトリウムを補充したＲＰＭＩ－１６４０培地中で培養した。細胞を加湿恒温器中で５％CO_2と一緒に３７℃でインキュベートした。

【０２６０】

（ｉｉｉ）細胞抽出物調製

培地を８０～９０％コンフルエントな細胞培養物から吸引し、細胞をＰＢＳで１回洗浄し、次いで８００μＬの２０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．０）、５００ｍＭ塩化ナトリウム及び２％ＳＤＳ溶液と一緒にインキュベートした。細胞を収集し、６５℃に加熱し、１分間超音波処理して細胞抽出物を調製した。次いで、生成した溶解物を２５ゲージ針に６回通した。細胞抽出物中の総タンパク質量を製造者の指示に従ってビシンコニン酸アッセイにより定量化した（Ｍｉｃｒｏ ＢＣＡキット、Ｐｉｅｒｃｅ、ロックフォード、ＩＬ、ＵＳＡ）。

【０２６１】

（ｉｖ）ウエスタンブロット法

細胞溶解物１０マイクログラムを加熱変性し（ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）ＬＤＳ試料緩衝剤及び還元剤中で１００℃で５分間）、次いで前もって成形されたゲルを用いて、ＸＣｅｌｌ ＳｕｒｅＬｏｃｋ Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）において１２０Ｖで１．５時間電気泳動させた。次いで、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜（Ｐｏｌｙｓｃｒｅｅｎ（登録商標）、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ビクトリア、オーストラリア）に移した。転写膜を０．１％（ｖ／ｖ）ＴＢＳ－ｔｗｅｅｎ中の５％（ｗ／ｖ）脱脂乳溶液を用いて室温で１時間ブロックし、一次抗体と一緒に４℃で終夜インキュベートした。膜を０．１％（ｖ／ｖ）ＴＢＳ－ｔｗｅｅｎで３×５分間洗浄し、次いでブロック溶液で１／２０００希釈した適切なＨＲＰ複合二次抗体と一緒にインキュベートした。Ｎｏｖｅｘ（登録商標）ＥＣＬ化学発光基質試薬キット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて膜を現像し、ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ（商標）ＬＡＳ４０００画像装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ニューサウスウェール

ズ、オーストラリア）を用いてタンパク質を可視化した。３つ組試料を分析し、ＡｌｐｈａＶｉｅｗＳＡ（商標）ソフトウェアｖ３．０．０．０（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ、サンタクララ、カリフォルニア）を用いて基準ＧＡＰＤＨ添加コントロールに対して画像を定量化した。クラスカル　ワリス順位和統計分析をＳｔａｔａ／ＳＥ　ｖ１１．２（ＳｔａｔａＣｏｒｐ　ＬＰ、テキサス、米国）を用いて実施して、非悪性コントロール細胞株群と癌細胞株群の間の有意性を求めた（９５％信頼限界；ｐ＜０．０５）。

【０２６２】

結果

（ｉ）前立腺癌細胞抽出物及び培地における現在の前立腺癌バイオマーカーの検出

ウエスタンブロット法を使用して、非悪性前立腺細胞株（ＲＷＰＥ－１、ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２）及び前立腺癌細胞株（２２ＲＶ１、ＬＮＣａＰ、ＣａＨＰＶ１０及びＤＵ－１４５；図１０）由来の細胞溶解物及び培地における前立腺酸性ホスファターゼ（ＰＡＰ：ｐｒｏｓｔａｔｉｃ　ａｃｉｄ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ）、前立腺特異抗原（ｈＫ３）及び他のカリクレイン（ｈＫ２、ｈＫ４及びｈＫ１５）の量を規定した。ＰＡＰの細胞内量は、前立腺癌細胞株２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰにおいて非悪性コントロール細胞株よりも高いが、タンパク質はＣａＨＰＶ１０及びＤＵ－１４５前立腺癌細胞株においてほとんど又は全く検出されなかった。同様に、ｈＫ２、ｈＫ３及びｈＫ４は、ＬＮＣａＰにおける細胞内タンパク質量が非悪性コントロール細胞株に比べて増加したが、他の前立腺癌細胞株においては最小量が検出された。細胞内ｈＫ１５量は、すべての前立腺癌細胞株並びに非悪性コントロール細胞株ＲＷＰＥ－１及びＰＮＴ２で類似していたが、ＰＮＴ１ａにおいて検出された量は少なかった。ＰＡＰ、ｈＫ３、ｈＫ２及びｈＫ４は、ＬＮＣａＰ細胞から分泌され、量は、他の前立腺癌及び非悪性コントロール細胞株に比べて増加した。特に、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰからのｈＫ１５の分泌は、他の前立腺癌及び非悪性コントロール細胞株に比べて増加した。これらの知見は、前立腺癌細胞株のタンパク質含有量及びＰＡＰ／カリクレイン分泌が可変であり、これらのマーカーが幾つかの前立腺癌細胞株と非悪性コントロール細胞株を識別できないことを示した。

【０２６３】

細胞抽出物におけるｈＫ２、ｈＫ４及びｈＫ１５の検出によって、非悪性コントロール細胞株と前立腺癌細胞株の識別に使用できない単一の分子形態が明らかになった。前立腺酸性ホスファターゼは、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株（４０及び３８ｋＤａ分子形態）において非悪性細胞株ＲＷＰＥ－１（３８ｋＤａ形態）よりも変動して処理されたが、他の細胞株にはなかった。同様に、ｈＫ３の２つの分子形態が２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株において検出されたが（２９及び２５ｋＤａ）、他のコントロール及び癌細胞株は２９ｋＤａ分子形態しか発現しなかった。分泌ｈＫ２及びｈＫ１５の検出によって、ＰＮＴ１ａに類似した分子形態（ｈＫ２の場合２７ｋＤａ、ｈＫ１５の場合２１ｋＤａ及び２５ｋＤａ）が明らかになったが、これらの分子形態は、他の非悪性コントロール及び癌細胞株においては検出されなかった。これは、一部の前立腺癌細胞株におけるタンパク質分解プロセシングが非悪性コントロール細胞株に比べて変わりやすいことを示している。

【０２６４】

カリクレインの分泌は、前立腺癌細胞株のアンドロゲン受容体状態と相関すると考えられ、分泌量は、一般に、細胞抽出物において検出された量と無関係であると考えられる。ｈＫ３、ｈＫ２及びｈＫ１５の分泌の増加は、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株で認められた。しかし、ｈＫ２量は、ＲＷＰＥ－１非悪性細胞由来の細胞抽出物において２２ＲＶ１よりも増加し、２２ＲＶ１癌細胞株からのこのマーカーの分泌はＲＷＰＥ－１非悪性コントロール細胞株に比べて増加した。カリクレイン量の増加は、アンドロゲンに反応する細胞株、又は活性化アンドロゲン受容体を有する細胞株において予想され、それによってアンドロゲン応答配列（ＡＲＥ：ａｎｄｒｏｇｅｎ－ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｅｌｅｍｅｎｔ）を含む遺伝子を活性化する。

【０２６５】

（ｉｉ）非悪性コントロール及び前立腺癌細胞抽出物及び培地におけるリソソームタンパク質の検出

ウエスタンブロット法を使用して、非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来の細胞溶解物及び培地における異なるリソソームタンパク質量を規定した（図１１、図１２）。細胞内αグルコシダーゼ（αＧｌｕｃ）、βグルコシダーゼ（βＧｌｕｃ）、αガラクトシダーゼＡ（αＧａｌ　Ａ）、ＬＡＭＰ－１及びカテプシンＤ（２６ｋＤａ）の量は、細胞株間で変動し、非悪性コントロールを前立腺癌細胞株から区別することができなかった。細胞抽出物におけるプロカテプシンＤ量は、非悪性コントロール、ＣａＨＰＶ１０及びＤＵ－１４５癌細胞株で類似していたが、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株の細胞抽出物において検出可能なタンパク質はなかった。βグルコシダーゼ、αガラクトシダーゼ、プロカテプシンＢ及びＤの分泌は、ＲＷＰＥ－１において他の非悪性細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２よりも増加した。ＲＷＰＥ－１から分泌されたαガラクトシダーゼの量は、ＣａＨＰＶ１０前立腺癌細胞株と類似していた。ＬＡＭＰ－１及びカテプシンＤ（２６ｋＤａ）分泌量は、非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株の各々で類似していた。２２ＲＶ１及びＤＵ－１４５前立腺癌細胞株は、αグルコシダーゼ及びβグルコシダーゼ分泌が他の前立腺癌及び非悪性コントロール細胞株よりも増加した。他の前立腺癌及び非悪性コントロール細胞株に比べて限られた量のカテプシンＢ（２２ｋＤａ）が２２ＲＶ１前立腺癌細胞株において検出された。プロカテプシンＢ量は、ＬＮＣａＰにおいて他の前立腺癌細胞株よりも増加した。ＲＷＰＥ－１は、プロカテプシンＢ量がＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２非悪性コントロール細胞株よりも増加した。カテプシンＢ（２２ｋＤａ）の分泌は、ＣａＨＰＶ１０、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株が、非悪性コントロール細胞株及び２２ＲＶ１前立腺癌細胞株よりも多かった。最小量の酸性セラミダーゼが非悪性コントロール細胞株並びに前立腺癌細胞株２２ＲＶ１、ＣａＨＰＶ１０及びＤＵ－１４５において検出された。それに対して、多量の酸性セラミダーゼがＬＮＣａＰ癌細胞株由来の細胞抽出物において検出された。酸性セラミダーゼ（１０～１５ｋＤａ）は非悪性コントロール細胞株から分泌されなかったが、２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ前立腺癌細胞株からはＣａＨＰＶ１０及び非悪性コントロール細胞株よりも多量に分泌された。これらの知見は、非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株でのリソソームタンパク質の細胞内含有量及び分泌が可変であり、非悪性コントロール細胞株と前立腺癌細胞株を識別するカテプシンＢ及び酸性セラミダーゼの可能性を示した。したがって、酸性セラミダーゼ及びカテプシンＢの分泌は、非悪性細胞株と癌細胞株を識別するある程度の能力をもたらし得る。

【０２６６】

複数の分子形態のαグルコシダーゼが非悪性及び前立腺癌細胞株の細胞抽出物において検出された。１１０ｋＤａ分子形態のαグルコシダーゼが２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰ癌細胞株において検出されたが、他の前立腺癌及び非悪性コントロール細胞株では最小量しか検出されなかった。βグルコシダーゼ及びＬＡＭＰ－１の分子量は、前立腺癌細胞株と非悪性細胞株では変動し、これらのタイプの細胞株を識別できなかった。２つの分子形態のαガラクトシダーゼＡ（４２及び４３ｋＤａ）が、ＣａＨＰＶ１０とＲＷＰＥ－１の両方の細胞株に存在したが、他の前立腺癌又は非悪性細胞株には存在しなかった。ＣａＨＰＶ１０とＲＷＰＥ－１の両方は、他の非悪性及び前立腺癌細胞株よりも少量の７０ｋＤａ分子形態のαグルコシダーゼを示した。興味深いことに、ＲＷＰＥ－１とＣａＨＰＶ１０の両方の細胞株において、αグルコシダーゼとαガラクトシダーゼＡで類似したタンパク質プロセシングが存在し、βグルコシダーゼの分子量が増加し、αガラクトシダーゼＡの分泌量が増加し、他の非悪性及び前立腺癌細胞株とは異なった。これは、これらの２つの細胞株を不死化するのに用いた技術が異なることと関連があった。２つの分子形態のプロカテプシンＢ（３７及び３９ｋＤａ）が、ＣａＨＰＶ１０、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ前立腺癌及びＲＷＰＥ－１非悪性コントロール細胞株の細胞抽出物において検出された。６０ｋＤａ分子形態のβグルコシダーゼがＲＷＰＥ－１及びＣａＨＰＶ１０細胞から分泌され、これは、他の細胞株からより多く拡散し、グリコシル化の可変性を示唆した。分泌形

態のαガラクトシダーゼＡの分子量は、前立腺癌細胞株２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰにおいて非悪性コントロール細胞株及びＣａＨＰＶ１０前立腺癌細胞株よりも小さかった。一部のリソソームタンパク質の可変プロセシング及び分泌増加は、前立腺癌細胞株と非悪性細胞株を識別するある程度の能力を有し得る。

【０２６７】

実施例３－生体内でのエンドソーム及びリソソーム遺伝子のマイクロアレイ発現プロファイリング

前立腺癌細胞においてエンドソーム生物学の変化が観察されたことは、特異的エンドソーム遺伝子及びタンパク質の発現の増加が、前立腺癌の発生及び又は進行に決定的に影響し得ることを示唆した。したがって、エンドソーム生合成の変化は、前立腺癌の診断及び予知に使用することができるバイオマーカーの研究に新しい道をもたらし得る。しかし、インビトロ観察と患者データを相関させて、新規変化が生物学的に関連することを確立することが重要であった。前立腺癌マイクロアレイデータベースにおけるエンドソーム関連遺伝子発現が変化することを検証することは、このプロセスにおける重要な第一ステップと考えられた。

【０２６８】

遺伝子マイクロアレイデータベースは、患者におけるバイオマーカー発現の調査を可能にし、公知の臨床パラメータとの関係を求め、次いで臨床成績を予測するのに使用することができる。

【０２６９】

患者の結果に関連してエンドソーム－リソソーム遺伝子発現を分析するために、ある範囲の前立腺癌マイクロアレイデータベースを調査のために選択した。複数のマイクロアレイコホートが、Ｏｎｃｏｍｉｎｅ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐｔｙ．，Ｌｔｄ．）又は遺伝子発現情報データベース（Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｏｍｎｉｂｕｓ）から分析用に入手可能である。メモリアル スローン ケタリングがんセンター（ＭＳＫＣＣ：Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｓｌｏａｎ－Ｋｅｔｔｅｒｉｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ）において前立腺全摘出術による治療を受けた最近の患者のコホートも選択し、本明細書ではテイラーコホートと称する。このコホートは、１５０個の原発性前立腺癌及び２９個の対応非悪性コントロール試料を含む。テイラーコホートの場合、試料を収集し、癌領域の特定前に瞬間凍結した。組織学的評価に基づいて７０％を超える癌細胞含有量の試料にＲＮＡ抽出を実施した。Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ Ｈｕｍａｎ Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイとｃＢｉｏ Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｐａｔｈｗａｙ Ｐｏｒｔａｌから得た生成マイクロアレイデータを用いて分析を実施した。このコホートは、さらに、インビトロで分析された関連するエンドソーム及びリソソーム遺伝子のすべての発現データを含むので選択された。さらに、このコホートに用いたＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）ＨＧＵ９５を用いた以前のマイクロアレイよりも配列精度が高いＲｅｆＳｅｑデータベースビルド３４（２００３年７月）由来の配列から作成された。トムリンスらによる追加のマイクロアレイも分析し、本明細書ではトムリンスコホートと称する。これは、別のマイクロアレイ技術、特に、市販されていない特注アレイを用いて作成された。このコホートは、非悪性前立腺組織（ｎ＝２７）、前立腺上皮内腫よう（ＰＩＮ：ｐｒｏｓｔａｔｉｃ ｉｎｔｒａｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｎｅｏｐｌａｓｉａ；ｎ＝１３）、原発性癌（ｎ＝３２）及び転移性癌組織（ｎ＝２０）を含む。したがって、テイラーコホートで得られた結果の確認に加えて、トムリンスコホートは、ＰＩＮから診断上関連し得る転移性癌への疾患進行中の遺伝子発現の評価が可能であった。トムリンスコホート用前立腺試料をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ：ｌａｓｅｒ－ｃａｐｔｕｒｅ ｍｉｃｒｏ－ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ）によって収集し、約１０，０００個の細胞を各試料から収集した。この試料収集方法は、特定の試料タイプに対する特異性を増大させ、癌周囲の組織を捕獲物から除外し、ＲＮＡ調製及び分析を浄化することができるので有利であった。グリンスキーらによって分析された前立腺癌患者組織は、治療後のＰＳＡレベルに基づく

再発を判定するために最初の癌検出から５年間モニターされた癌患者を含み、したがって癌進行中の発現を分析することによって、エンドソーム又はリソソーム遺伝子の予知能力を判定することができる。これらの異なるマイクロアレイデータベースの解析は、培養細胞を用いてインビトロで認められた遺伝子発現の変化を検証すること、及び患者試料におけるマーカー発現の一貫性の何らかの指標を提供することを目的とした。

【０２７０】

結果

（ｉ）前立腺癌におけるリソソーム関連遺伝子の発現は、ＴＦＥＢ発現とは無関係に変化する。

エンドソーム及びリソソーム生合成に影響するＬＩＭＰ２などのリソソーム関連遺伝子の転写は、転写因子ＥＢ（ＴＦＥＢ：ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ ＥＢ）によって調節される。したがって、ＴＦＥＢ遺伝子発現は、生体内でエンドソーム及びリソソーム生物学が変化した証拠となり得る。ＴＦＥＢの発現は、前立腺癌においては非悪性コントロール前立腺組織に比べて変化せず（図１３）、一方、ＬＩＭＰ２の発現は、前立腺癌においては非悪性組織よりも有意に増加した（Ｐ≦０．０００１）。逆に、やはりＴＦＥＢの標的であるＬＡＭＰ１は、前立腺癌における発現が非悪性コントロール組織に比べて有意に減少した（Ｐ≦０．０１）。ＴＦＥＢによって調節される他のリソソーム遺伝子を分析して、その発現がこの転写因子とは無関係に変化するかどうか判定した（図１４）。カテプシンＢ（ＣＴＳＢ）は、テイラーコホートを用いた前立腺癌組織における発現が非悪性コントロール組織に比べて有意に減少し（Ｐ≦０．０００１）、一方、αグルコシダーゼ（ＧＡＡ）は、前立腺癌における発現が非悪性コントロール組織に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０５）。酸性セラミダーゼ、βグルコシダーゼ（ＧＢＡ）及びαガラクトシダーゼＡ（ＧＬＡ）の発現は、テイラーコホートにおける前立腺癌組織において非悪性コントロール組織に比べて有意に変化しなかった。

【０２７１】

（ｉｉ）ＡＰＰＬ１は、原発性前立腺癌組織における発現が有意に増加した。

ＡＰＰＬ１遺伝子発現は、テイラーコホート由来の前立腺癌組織において非悪性コントロール組織に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０５；図１５）。しかし、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５Ａ、ＥＥＡ１、ＲＡＢ４Ａ及びＲＡＢ７Ａの発現の増加がインビトロで認められたが、原発性前立腺癌におけるこれらのエンドソーム関連遺伝子の発現は非悪性前立腺組織に比べて有意差がなかった（図１５）。

【０２７２】

（ｉｖ）リソソーム遺伝子発現（図１６）及び初期エンドソーム関連遺伝子発現（図１７）は、癌進行中に変化した。

エンドソーム及びリソソーム関連ｍＲＮＡ転写物の発現も、原発性癌及び非悪性組織に加えて前立腺上皮内腫よう（ＰＩＮ）及び転移性癌組織の分析が可能なトムリンスコホートから分析した。ＴＦＥＢなどの幾つかの遺伝子の発現データは、テイラーらによって使用された市販マイクロアレイに比べて、用いたマイクロアレイ技術が特注であり、プローブセットがより限定されるために、利用できなかった。トムリンスコホートにおけるＬＩＭＰ２及びＬＡＭＰ１の遺伝子発現は、非悪性コントロール組織と原発性前立腺癌組織で有意な変化がなかった（図１６）。ＴＦＥＢによって調節される他の遺伝子は、前立腺癌組織において非悪性コントロール組織に比べて発現に差があり、カテプシンＢは、原発性癌組織において非悪性組織よりも有意に減少したが（Ｐ≦０．０５）、トムリンスマイクロアレイ由来の非悪性組織と原発性癌組織ではカテプシンＤ、酸性セラミダーゼ、αグルコシダーゼ又はαガラクトシダーゼＡの発現に有意な変化はなかった（図１６）。このコホートにおけるβグルコシダーゼは、発現データを利用できなかった。

【０２７３】

進行性の病態を通した遺伝子発現の分析によって、前立腺上皮内腫よう（ＰＩＮ）におけるＬＩＭＰ２発現の有意な増加が明らかになった（Ｐ≦０．０５；図１６）。ＬＩＭＰ２発現の変化が転移性組織において認められたが、平均減少は統計的に有意でなかった。

ＬＡＭＰ１発現は、ＰＩＮ及び原発性癌において非悪性組織よりも増加し、転移性組織における発現は、ＰＩＮ（Ｐ≦０．０５）及び原発性前立腺癌組織（Ｐ≦０．００１）に比べて有意に減少した。原発性前立腺癌及び転移性組織におけるカテプシンＢ発現は、非悪性コントロール組織に比べて有意に下方制御された（それぞれＰ≦０．０５及びＰ≦０．００１）。カテプシンＤ発現は、ＰＩＮ、原発性癌及び転移性病態を通して幾らか減少したが、これは非悪性コントロール組織に比べて統計的に有意でなかった。原発性癌組織においては、酸性セラミダーゼは、非悪性コントロール組織と類似した発現を示したが、ＰＩＮ組織発現は、非悪性コントロール及び原発性癌組織に比べて有意に増加した（それぞれＰ≦０．０１及びＰ≦０．０５）。ＡＳＡＨ１の発現は、転移性前立腺組織において非悪性コントロール（Ｐ≦０．０１）、ＰＩＮ（Ｐ≦０．００１）及び原発性癌組織（Ｐ≦０．００１）に比べて有意に減少した。

【０２７４】

ＡＰＰＬ１発現は、原発性前立腺癌において非悪性コントロール組織に比べて有意に増加したが（Ｐ≦０．０５；図１７）、転移性前立腺組織と非悪性組織のＡＰＰＬ１の発現に有意な変化はなかった。ＡＰＰＬ２の発現は、ＰＩＮ及び原発性前立腺癌において非悪性コントロール組織に比べて有意に増加したが（それぞれＰ≦０．０５及びＰ≦０．０１）、転移性組織は、非悪性組織と類似した量のＡＰＰＬ２を発現し、これは、ＰＩＮ及び原発性前立腺癌組織に比べて有意に減少した（それぞれＰ≦０．０１及びＰ≦０．００１）。ＲＡＢ５Ａの発現は、転移性前立腺組織において原発性前立腺癌組織に比べて有意に減少したが（Ｐ≦０．０５）、非悪性、ＰＩＮ又は原発性前立腺癌組織における発現に有意な変化はなかった。ＥＥＡ１の発現は、原発性癌において非悪性組織よりも有意に増加したが（Ｐ≦０．０１）、転移性組織のＥＥＡ１発現においては原発性前立腺癌（Ｐ≦０．００１）及びＰＩＮ組織（Ｐ≦０．０５）に比べて有意な減少が認められた。ＲＡＢ４Ａの発現は、原発性前立腺癌において非悪性コントロール組織と類似し、ＰＩＮ組織におけるＲＡＢ４Ａの発現は、原発性前立腺癌組織に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０５）。転移性前立腺組織におけるＲＡＢ４Ａの発現は非悪性コントロール（Ｐ≦０．００１）、ＰＩＮ（Ｐ≦０．００１）及び原発性前立腺癌組織（Ｐ≦０．０１）に比べて有意に減少した。トムリンスマイクロアレイ由来のＰＩＮ、原発性癌又は転移性癌において認められたＲＡＢ７Ａの発現は、非悪性コントロール組織に比べて有意な変化がなかった。

【０２７５】

（ｖ）カテプシンＢは、前立腺癌患者の生存転帰を判定する際にある予後値を示すと考えられた。

幾つかのリソソーム及びエンドソーム遺伝子の発現は、ＰＩＮ、原発性癌及び転移性癌進行を通して変わるので、遺伝子発現の定量化は、前立腺癌の予知のための貴重なツールであり得る。リソソーム遺伝子の予知可能性を評価するために、本発明者らは、遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングを利用して、グリンスキーコホート由来の患者を２つの群に分類した。グリンスキーコホートマイクロアレイは、生検時に検出される初期ＰＳＡレベルのデータ、及び治療後の再発についての情報を提供する。高又は低カテプシンＢ発現のクラスタリングによって、カテプシンＢ発現の少ない患者は、生化学的再発（ＢＣＲ：ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ｒｅｃｕｒｒｅｎｃｅ）のリスクが有意に増加したことが明らかになった。（図１８）。ＬＩＭＰ２、ＬＡＭＰ１、カテプシンＤ、酸性セラミダーゼ又はαガラクトシダーゼＡ遺伝子の高又は低発現によるグループ化は、患者を予後群に有意に層別化しなかったが、αガラクトシダーゼＡでは傾向が認められた（Ｐ＝０．０７７；図１８）。テイラー及びトムリンスコホートにおいて認められた初期エンドソーム関連遺伝子の発現の増加から、本発明者らは、患者を予後群に層別化するこれらの初期エンドソーム関連遺伝子の可能性を分析した（図１９）。しかし、Ｋ平均クラスタリングによって個々の初期エンドソーム遺伝子の発現に基づいて患者を２つの群に分類しても、患者は予後群に有意に区分されなかった。

【０２７６】

（ｖｉ）リソソーム及びエンドソーム遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、低ＰＳ

Ａタンパク質レベルを発現する癌患者において有意な予後値を示した。
診断時に７．９ｎｇ／ｍＬを超えるＰＳＡタンパク質を発現する患者は、ＢＣＲのリスクが低発現群に比べて有意に増加したが（ＨＲ２．４２２、Ｐ＝０．００８７；図２０）、低ＰＳＡを発現するＢＣＲの患者の一部（３４％）は診断及び予後のアッセイの改善から利点を得るであろう。ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの患者を高遺伝子発現群と低遺伝子発現群に層別化すると、高ＬＩＭＰ２発現の傾向は、ＢＣＲの増加を招くことが明らかになった（図２０Ｂ）。ＬＡＭＰ１の発現は、予後値を示すようには見えなかった。カテプシンＢ発現によるクラスタリングは、低発現群の患者が高発現群に比べてＢＣＲのリスクが有意であることを示した（ＨＲ０．２７５２、Ｐ＝０．０１９；図２０Ｂ）。αガラクトシダーゼＡの低発現によっても、ＢＣＲのリスクがより高い群に患者を層別化することができた（ＨＲ０．３８５９、Ｐ＝０．０３９６；図２０Ｂ）。

【０２７７】
個々のＲＡＢ５Ａ、ＡＰＰＬ１及びＥＥＡ１遺伝子発現によって、患者を統計的に有意なリスク群に層別化することができなかった（図２１Ａ）。しかし、Ｋ平均クラスタリング法を用いた３遺伝子サインの発現に基づく患者の層別化は、ＲＡＢ５Ａ、ＡＰＰＬ１及びＥＥＡ１の組合せの低又は高発現の２つの群に患者を確実に区分した（図２１Ａ）。カプラン　マイヤー生存率分析によれば、３遺伝子サインの高発現群の患者は、ＢＣＲのリスクが低発現群よりも有意に高かった（ＨＲ４．１３８、Ｐ＝０．０２２１、９５％ＣＩ１．３９５０～２．２７０；図２１Ｂ）。

【０２７８】
考察
エンドソーム及びリソソーム生合成は、通常、「ＣＬＥＡＲ配列」を含むリソソーム遺伝子の転写因子の制御を介して、転写因子「ＥＢ」（ＴＦＥＢ）によって調節される。ＴＦＥＢの標的遺伝子としては、前立腺癌細胞株において発現が異なるＬＩＭＰ２及びＬＡＭＰ１が挙げられる。本発明者らは、これらのマイクロアレイ由来の前立腺癌組織におけるＬＩＭＰ２遺伝子発現の増加及びＬＡＭＰ１遺伝子発現の減少も認めたが、ＴＦＥＢ発現に変化はなく、ＴＦＥＢの正常な作用が前立腺癌において変化し得ることを示唆している。

【０２７９】
癌発達中の遺伝子発現の変化は、貴重な予後指標であり得る。酸性セラミダーゼ（ＡＳＡＨ１）の発現の増加は、前癌性ＰＩＮ病変部の診断に有効であり得、介入後の予後の改善に関連し得る。

【０２８０】
多変量リスク分析並びに低リスク群と高リスク群への患者の層別化は、より個別化された手法を前立腺癌の検出及び治療にもたらし、過剰診断及び過剰治療を削減し、それによって患者の罹患率及び死亡率を減少させ得る。低リスク前立腺癌を有すると思われる患者にしばしば監視療法が用いられるが（例えば、臨床カテゴリＴ１ｃ、グリーソンスコア≦６、及びＰＳＡ≦１０ｎｇ／ｍＬ）、高齢男性は、これらの低いスコア及びＰＳＡ血清レベルにもかかわらず前立腺癌による死亡リスクが増加する。慎重な経過観察群である低ＰＳＡを発現する前立腺癌患者の生存曲線を検討すると、侵襲性であり、より急速な再発を招く前立腺癌が明らかになるが、グリーソンスコアなどの追加の因子は、患者の層別化を改善することができる。３種のエンドソーム遺伝子ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ１及びＲａｂ５Ａの遺伝子サインの定量化によって、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ１及びＲａｂ５Ａは、ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬを発現する前立腺癌患者において、患者を高リスク再発群と低リスク再発群に層別化した。患者を予後リスク群に層別化するこれらのエンドソーム遺伝子の能力は、それらが前立腺癌の発生及び進行に重要な役割を果たし、したがって新しい治療標的になり得ることを示唆している。

【０２８１】
実施例４－前立腺癌の検出のためのエンドソームマーカー分泌の評価
結果

（ｉ）細胞外エンドソームタンパク質は、非悪性細胞株と前立腺癌細胞株を区別する（図２）。前立腺癌由来の培地において検出されたＡＰＰＬ１及びＡＰＰＬ２の量は、非悪性コントロール細胞株に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０１）。前立腺癌細胞株由来の培地において検出されたＲａｂ５Ａの量も、非悪性コントロールに比べて有意に増加した（約２０％；Ｐ≦０．０５）。ＥＥＡ１は、ＬＮＣａＰ及び２２ＲＶ１前立腺癌細胞株由来の培地において検出されたが、非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ又はＰＮＴ２由来の培地においては検出されなかった（Ｐ≦０．０１）。前立腺癌由来の培地において検出されたＲａｂ４の量は、非悪性コントロール細胞株に比べて有意に増加したが（Ｐ≦０．０５）、後者、すなわちＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２細胞株において検出された量は変わりやすかった。前立腺癌由来の培地において検出されたＲａｂ７の量は、非悪性コントロール細胞株に比べて有意に減少した（Ｐ≦０．０５）。

【０２８２】

考察

現在、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）は診断マーカーとして使用されるが、これは信頼性に問題があり、予想される癌発生過程を更に決定するためには侵襲性の生検を依然として必要とする。したがって、前立腺癌の正確な検出及び予知を可能にし、無用な侵襲性の費用のかかる手順を不要にする新しいバイオマーカーが緊急に必要である。本発明者らは、前立腺癌細胞株由来の培地において検出された初期エンドソームマーカーの量の有意な増加を認めた。特に、ＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２、Ｒａｂ５Ａ及びＥＥＡ１並びにリサイクリングエンドソームタンパク質Ｒａｂ４を含めた初期エンドソームに関連した小胞機構は、前立腺癌細胞株由来の培地において著しく増加したが、後期エンドソームタンパク質Ｒａｂ７は、前立腺癌細胞において非悪性コントロールよりも有意に減少した。

【０２８３】

前立腺癌細胞株由来の後期エンドソームマーカーＲａｂ７ではなく初期エンドソームマーカーＡＰＰＬ１、ＡＰＰＬ２及びＥＥＡ１の分泌は、多胞体及びエキソソーム小胞へのエンドソーム区画の成熟が前立腺癌において変化し、したがって前立腺癌を非悪性組織から識別するのに使用できることを暗示した。

【０２８４】

前立腺癌においてエキソソーム形成が妨害され得る機序は、小胞ＧＴＰアーゼＲａｂ５を含む。Ｒａｂ５の過剰発現によって、ＰＩ３Ｐ結合領域とＡＰＰＬ結合領域が同時にＲａｂ５タンパク質に暴露され、ＡＰＰＬ１の解離を効果的に減少させ、同時にＥＥＡ１の結合を可能にする。したがって、これは、Ｒａｂ５、ＥＥＡ１及びＡＰＰＬ１陽性であるエンドソームをもたらし得る。エキソソームを形成するエンドソーム膜の崩壊及び陥入の開始は、ＰＩ３Ｐ、並びにＨｒｓ及びＥＳＣＲＴ複合体の動員によって惹起される。前立腺癌エンドソーム上のエンドソーム小胞機構の異常組成物は、初期エンドソームにおけるエキソソーム形成の素因になり得る。その場合、初期エンドソームからのこれらのエキソソームの放出は、初期エンドソーム小胞機構の明白な分泌が前立腺癌細胞株から認められる原因になるであろう。このＲａｂ５、ＥＥＡ１及びＡＰＰＬ１分泌は、前立腺癌の検出を可能にするアッセイの基礎になり得る。

【０２８５】

血液及び尿は、非侵襲的な診断アッセイの分析物候補であるので、エキソソームにおいて分泌される小胞機構を検出するための理想的な患者試料である。

【０２８６】

非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株に比べて認められた初期エンドソーム及び後期エンドソームマーカーの分泌の変化は、前立腺癌のより正確な検出及び予知をもたらし得る診断及び予知マーカーの研究に新しい道をもたらす。ここでのデータは、エンドソーム生物学が前立腺癌において妨害され、前立腺癌細胞株からの初期エンドソームマーカーの分泌の増加、及び後期エンドソームマーカーの分泌の減少をもたらすという考えを支持するものである。総合すると、これらの結果は、初期エンドソームマーカーと後期エンドソームマーカーの分泌の変化が前立腺癌の早期検出に必要な区別を与え得ることを示唆して

いる。

【０２８７】

実施例５－一般材料及び方法

材料

抗体及び蛍光プローブ

下表１に共焦点顕微鏡法分析に用いた蛍光複合物抗体の諸性質を詳述する。同じ宿主種の２種の一次抗体を用いて二重標識する場合、Ｚｅｎｏｎ（登録商標）ＩｇＧ標識化キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を使用して、一次抗体を直接標識した。標識化プロトコルを製造者の指示に従って実施した。ウエスタンブロット法及び免疫蛍光に用いた一次抗体及び二次複合物の具体的濃度を下表に詳述する。

【０２８８】

【表１】

表１　レーザー走査型共焦点顕微鏡法に用いた蛍光プローブ

蛍光団		最大励起(λ)	最大発光(λ)	検出スペクトル (nm)
DAPI		358	461	407 – 471
ファロイジン Alexa Fluor（登録商標）488		495	518	500– 560
Alexa Fluor（登録商標） 488		495	519	500 – 550
Zenon（登録商標） 488		495	519	500 – 550
LysoTracker（登録商標）Green DND-26		504	511	505 – 560
LysoTracker（登録商標） Red DND-99		577	590	590 – 700
Zenon（登録商標） 568		578	603	570 – 630
Cy3		550	570	570 – 630
Alexa Fluor（登録商標） 633		632	647	650 – 730
トランスフェリン Alexa Fluor（登録商標） 633		632	647	650 – 730

【０２８９】

【表２】

表２　ウエスタンブロット分析に用いた一次及び二次抗体

抗体	使用濃度	供給源カタログ番号
M-カテプシン B	0.25 μg/mL	ab58802
M-カテプシン D	5 μg/mL	ab6313
Rb-酸性セラミダーゼ	1 μg/mL	ab74469
Sh-α-グルコシダーゼ	1 μg/mL	内製
Sh-β-グルコシダーゼ	1 μg/mL	内製
Sh-α-ガラクトシダーゼ A	1 μg/mL	内製
M-前立腺酸性ホスファターゼ	1 μg/mL	ab75704
Rb-KLK2	1 μg/mL	ab40948
Rb-KLK3	1 μg/mL	ab40949
Rb-KLK4	1 μg/mL	ab40950
Rb-KLK15	1 μg/mL	ab40961
M-TFEB	1 μg/mL	ab56330
Rb-TfR1	1 μg/mL	ab108985
Rb-TfR2	1 μg/mL	ab80194
Sh-LIMP2	5 μg/mL	内製
Rb-APPL1	0.4 μg/mL	ab95195
Rb-APPL2	0.4 μg/mL	ab95196
G-RAB5A	1 μg/mL	R9704
G-EEA1	1 μg/mL	sc-6415
Rb-RAB4	1 μg/mL	ab13252
G-RAB7A	1 μg/mL	Sc-6563
M-LAMP1 BB6	1 μg/mL	内製
Rb-AKT	2 μg/mL	内製
Rb-AKT-P	2 μg/mL	内製
M-GAPDH HRP	1/20000	G9295
G-α-ウサギ HRP	1/2000	A6154
G-α-マウス HRP	1/2000	A4416
D-α-ヒツジ／ヤギ HRP	1/2000	AB324P

【０２９０】

【表３】

表３　免疫蛍光アッセイに用いた一次抗体及び蛍光団

抗体	使用濃度	供給源カタログ番号
Rb- TfR1	5 μg/mL	ab108985
Rb- TfR2	5 μg/mL	ab80194
Sh- LIMP2	10 μg/mL	内製
Rb- APPL1	2 μg/mL	ab95195
G- RAB5A	4 μg/mL	R9704
G- EEA1	4 μg/mL	sc-6415
Rb- RAB4	4 μg/mL	ab13252
G- RAB7A	4 μg/mL	Sc-6563
M- LAMP1 BB6	5 μg/mL	内製
Rb- TGN46	10 μg/mL	ab50595
LysoTracker（登録商標）488	5 μM (1/200)	L7535
トランスフェリン 633	5 μg/mL	T23362
ファロイジン 488	1/100	A12379
D-α-マウス Alexa fluor（登録商標）488	1/250	A11055
D-α-ヒツジ Alexa fluor（登録商標）488	1/250	A11015
D-α-ヤギ Cy3	1/250	AP180C

【０２９１】

細胞培養及び抽出物調製

細胞株

細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２、２２ＲＶ１及びＬＮＣａＰクローンＦＣＧを細胞バンクオーストラリア（ＣｅｌｌＢａｎｋ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）（小児医学研究所（Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を介して欧州細胞培養コレクション（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ）から得た。細胞株ＲＷＰＥ１、ＣａＨＰＶ１０及びＤＵ１４５を、Ｃｒｙｏｓｉｔｅ（Ｃｒｙｏｓｉｔｅ　Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を介してアメリカ培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）から入手した。これらの細胞株は、交差汚染又は誤認細胞株のリスト（Ｌｉｓｔ　ｏｆ　Ｃｒｏｓｓ－Ｃｏｎｔａｍｉｎａｔｅｄ　ｏｒ　Ｍｉｓｉｄｅｎｔｉｆｉｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｌｉｎｅｓ）バージョン６．８（２０１２年３月９日）にはない。

【０２９２】

前立腺癌の試験は、正常な非癌性前立腺に対しても同様にされなくてはならない。原発性又は転移性前立腺癌由来の細胞株の分析には、健常な前立腺組織由来の細胞株が必要である。これには、正常細胞の正常な分裂及び複製サイクルに関する細胞培養の問題がある。規則的な速度で増殖する大部分の癌細胞株とは異なり、非癌性細胞株を生成するには、一定の細胞周期及び分裂速度を引き起こす正常細胞を発生させなければならない。

【０２９３】

したがって、この試験に用いられる正常な上皮細胞表現型を示す細胞株ＲＷＰＥ１、ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２を改作し、ウイルスで不死化した。具体的には、ヒトパピローマウイルス１８（ＨＰＶ１８：ｈｕｍａｎ　ｐａｐｉｌｌｏｍａ　ｖｉｒｕｓ－１８）を使用してＲＷＰＥ１細胞株を不死化し、サル空胞形成ウイルス４０（ＳＶ４０：Ｓｉｍｉａｎ　ｖａｃｕｏｌａｔｉｎｇ　ｖｉｒｕｓ　４０）を使用してＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２細胞株を不死化した。癌細胞株ＣａＨＰＶ１０を、ＨＰＶ１８で不死化した前立腺の原発性腺癌から誘導した。この細胞株は、アンドロゲンに反応しない。

【０２９４】

２２ＲＶ１癌細胞株を異種移植片から誘導した。異種移植片は、去勢によって誘導された親のアンドロゲン依存性異種移植片の退行及び再発後にマウスにおいて連続的に増殖されたものである。この細胞株は、アンドロゲン受容体を発現するが、その増殖は、アンドロゲン刺激に反応しない。

【０２９５】

癌細胞株ＬＮＣａＰを前立腺腺癌のリンパ節転移から前もって誘導した。ＬＮＣａＰ細胞株は、アンドロゲン応答性である。

【０２９６】

癌細胞株ＤＵ１４５を前立腺腺癌の中分化脳転移から前もって誘導した。それらは上皮細胞であり、アンドロゲン刺激に反応しない。

【０２９７】

培養条件

ＰＮＴ１ａ、ＰＮＴ２及び２２ＲＶ１細胞株を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）（Ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）及び２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を補充したロズウェルパーク記念研究所（ＲＰＭＩ）１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で維持した。ＲＷＰＥ１及びＣａＨＰＶ１０細胞株を、供給されたヒト組換え上皮成長因子１　５３（ＥＧＦ１　５３）及びウシ下垂体抽出物（ＢＰＥ）を補充した、Ｌ－グルタミンを含む角化細胞無血清培地（Ｋ－ＳＦＭ）（Ｇｉｂｃｏ（登録商標））中で維持した。ＤＵ１４５細胞株を最小必須培地（ＭＥＭ）（Ｇｉｂｃｏ（登録商標））中で維持し、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン及び１０％ＦＣＳを補充した。癌細胞株ＬＮＣａＰを、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１０％ＦＣＳ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び１ｍＭピルビン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中で維持した。Ｓａｎｙｏ　ＭＣＯ－１７ＡＩ　CO_2恒温器（Ｓａｎｙｏ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ．、大阪、日本）中で加湿恒温器中で３７℃で５％CO_2と一緒に細胞をインキュベートした。

【０２９８】

細胞を約９０％コンフルエントで継代し、無菌ｄＰＢＳ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で洗浄し、培養フラスコ表面から分離するまで、０．１２％トリプシン、０．０２％ＥＤＴＡを含有する１×トリプシン－ＥＤＴＡ溶液（ＳＡＦＣ（登録商標）、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）でトリプシン処理した。１０％ＲＷＰＥ１を含む増殖培地でトリプシンを中和し、無血清培地中で培養したＣａＨＰＶ１０細胞株を２５０ｇで５分間ペレット化し、ｄＰＢＳで洗浄してウシ胎仔血清を除去した。細胞を一般的な維持のために１：１０から１：２０比で継代した。

【０２９９】

長期貯蔵の場合、細胞株を液体窒素中に貯蔵した。凍結保存の場合、細胞培養物を通常通りに継代した。１０％ＦＣＳを用いたトリプシン不活性化後、細胞を２５０ｇで５分間遠心分離してペレット化し、１０％ＦＣＳ及び１０％ＤＭＳＯを含むそれぞれの培地（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）に再懸濁させた。液体窒素中に長期貯蔵する前に、１ｍＬ分量の細胞懸濁液をイソプロパノール凍結容器（ナルゲン、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）に－８０℃で終夜貯蔵した。

【０３００】

試料調製

免疫ブロッティングのための細胞抽出物調製

細胞株をＴ７５フラスコ中に播種し、３７℃及び５％ＣＯ２でインキュベートした。８０～９０％コンフルエントで、培地を吸引し、細胞をｄＰＢＳで１回洗浄し、細胞を無血清培地と一緒に４８時間インキュベートした。

【０３０１】

Ｍｉｌｌｉ－Ｑ　Ｈ２Ｏで希釈した２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．０）、５００ｍＭ塩化ナトリウム及び２％ＳＤＳ溶液を含むＴＮＳ緩衝剤を用いて全細胞タンパク質を抽出した。Ｔｒｉｓ及び塩化ナトリウムを含有する溶液を最終体積の８０％に調製し、残りの２０％体積は１０％ＳＤＳを含み、使用前の３０分以内に添加した。４８時間のインキュベーション後、細胞培養培地を吸引し、細胞を室温ｄＰＢＳで２回洗浄した。ＴＮＳ緩衝剤８００μＬを培養フラスコに添加し、回転させて、細胞層全体を覆った。ゴム製の細胞かき取り器を用いて細胞を収集し、得られた抽出物を１．５ｍＬ管に移した。抽出物をすぐに６５℃に５分間加熱し、高周波で１分間超音波処理した。

【０３０２】

より均質な溶解物を得るために、細胞材料を２５ゲージ（０．６５ｍｍ）シリンジ針に合計６回通した。必要に応じて、追加のＴＮＳ緩衝剤を添加して、より低粘ちゅう性の溶解物を生成した。試料を－２０℃で貯蔵した。

【０３０３】

総タンパク質量を製造者の指示に従ってビシンコニン酸アッセイにより定量化した（Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡキット、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ロックフォード、ＩＬ、ＵＳＡ）。Ｗａｌｌａｃ　Ｖｉｃｔｏｒ（商標）光学プレートリーダー及びＷｏｒｋｏｕｔソフトウェアｖ２．０（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）、５点パラメータ検量線を用いて試料を定量化した。

【０３０４】

細胞収集時に収集し、前もって－８０℃で貯蔵した馴化培地を解凍し、３３ｍＬ分量を１０００ｇで４℃で１０分間遠心分離して、細胞片を除去した。上清３０ｍＬを５０ｍＬ円錐管に移し、デオキシコール酸ナトリウム（ＤＯＣ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を最終０．０２％ｖ／ｖ濃度まで添加した。短時間のボルテックス撹拌後、試料を氷上で３０分間保持した。

【０３０５】

トリクロロ酢酸（ＴＣＡ：ｔｒｉｃｈｌｏｒｏａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）の１００％ｗ／ｖ溶液を最終濃度１５％ｖ／ｖまで添加し、３０秒間ボルテックス撹拌し、氷上で２時間インキュベートして、タンパク質を培地から沈殿させた。沈殿したタンパク質を５，５００ｇで３０分間の試料の遠心分離によって収集し、ＴＣＡ及び混入廃棄物を含む上清を吸引した。タンパク質ペレットを、４ｍＬ氷冷（－２０℃）アセトンを用いてボルテックスによって洗浄し、室温で５分間インキュベートした。試料を５，５００ｇで３０分間更に遠心分離し、アセトン洗浄を繰り返した。最終遠心分離ステップ後、上清を吸引し、窒素ガスをゆっくり流してタンパク質ペレットを含む円錐管を乾燥させた。培地３０ｍＬから作製された各タンパク質ペレットを１３５μＬ１×ＳＤＳ－試料緩衝剤／ＰＢＳ溶液に再懸濁させ、後でウエスタンブロットアッセイに使用す

るために－２０℃で貯蔵した。

【０３０６】

遺伝子発現の定量分析のための細胞抽出物調製

ウエスタンブロット法に関して上述したように細胞株を７５ｃｍ^{2}フラスコ中で３つ組で血清枯渇状態で４８時間培養した。培地を吸引し、フラスコをｄＰＢＳで洗浄した。１ｍＬ　ＴＲＩ試薬（登録商標）（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を各Ｔ７５フラスコに添加し、ゴム製の細胞かき取り器を用いてかき取り、押し上げ蓋の付いた１．５ｍＬ管に移した。更に必要になるまで試料を－８０℃で貯蔵した。

【０３０７】

共焦点顕微鏡法による免疫蛍光分析のための細胞培養物調製

細胞培養物を通常通りに継代し、２２ｍｍ「Ｎｕｍｂｅｒ　１」カバーガラス（Ｍｅｎｚｅｌ－Ｇｌａｓｅｒ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）上に低密度で播種し、培地中で３７℃、５％CO_2雰囲気で４８時間インキュベートした。４８時間後、培地を吸引し、４％ホルムアルデヒド（ｖ／ｖ）ＰＢＳ溶液を用いて細胞を室温で２０分間固定した。固定細胞をＰＢＳ中の０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ（ｖ／ｖ）で１０分間更に透過処理した。

【０３０８】

タンパク質発現の定量分析

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び転写

細胞溶解物由来の総タンパク１０μｇを、試料緩衝剤（ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）ＬＤＳ試料緩衝剤（４ｘ）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び５０ｍＭジチオトレイトールを含む還元剤（ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）試料還元剤（１０ｘ））中で１００℃で５分間加熱変性した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ泳動用緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で緩衝されたＸＣｅｌｌ　ＳｕｒｅＬｏｃｋ（商標）Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌ電気泳動システムにおいて１０％１５ウェル又は１２％１７ウェルＳＤＳ－ＰＡＧＥプレキャストゲルを用いて調製試料を１２０Ｖ（固定、電流は可変）で１．５時間分離した。電気泳動後、分離したタンパク質をポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ：ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅ　ｄｉｆｌｕｏｒｉｄｅ）膜（Ｐｏｌｙｓｃｒｅｅｎ（登録商標）、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）に３５Ｖで１時間移した。

【０３０９】

免疫ブロット及び検出

膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎ（０．１％）中の５％ｗ／ｖ脱脂乳溶液を用いて室温で１時間ブロックし、５％脱脂乳で希釈した適切な抗体（表２．２）と一緒に静かに撹拌しながら４℃で終夜インキュベートした。一次抗体と一緒にインキュベーション後、膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎで３回室温で５分間洗浄した。５％脱脂乳溶液で１／２０００希釈したセイヨウワサビ－ペルオキシダーゼ複合二次抗体（表２．２）をＰＶＤＦ膜と一緒に静かに撹拌しながら室温で１時間インキュベートした。

【０３１０】

膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎで５分間３回洗浄し、続いて抗体を電気化学発光（ＥＣＬ：ｅｌｅｃｔｒｏ　ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）によって検出した。Ｎｏｖｅｘ（登録商標）ＥＣＬ化学発光基質試薬キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて膜を暗所で１分間インキュベートし、ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ（商標）ＬＡＳ４０００画像装置、ソフトウェアバージョン１．２．０．１０１（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を用いて可視化した。ヤギαＧＡＰＤＨ　ＨＲＰ複合物（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いて５％脱脂乳中で１：２０，０００希釈でＧＡＰＤＨ添加コントロールを検出した。ＧＡＰＤＨの検出も一次抗体の二次ＨＲＰ検出と同時に室温で１時間実施した。この場合、分子量によって検出が可能になるはずである。ＧＡＰＤＨの分子量とマーカータ

ンパク質の分子量が競合する可能性がある場合、ＰＶＤＦ膜から一次抗体を取り除き、αＧＡＰＤＨ　ＨＲＰ複合物で再検出した。

【０３１１】

ブロットを３つ組で実施し、画像をＡｌｐｈａＶｉｅｗＳＡ（商標）ソフトウェアｖ３．０．０．０（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ、サンタクララ、カリフォルニア）を用いて定量化した。このソフトウェアを用いてレーン分析を行い、検出したタンパク質の分子量を測定した。タンパク質量をシグナル密度及びバンドサイズに基づいて定量化し、バンド分析から得られたＧＡＰＤＨシグナルに対して規格化した。試料及び群サイズに応じてクラスター線形回帰又はクラスカル　ワリス順位和統計法を使用して、コントロール細胞株と癌細胞株の検出タンパク質量の有意性を判断した。Ｓｔａｔａ／ＳＥ　ｖ１１．２（ＳｔａｔａＣｏｒｐ　ＬＰ、テキサス、米国）を用いて試験した。有意な結果は、９５％を超える信頼度であった（Ｐ≦０．０５）。

【０３１２】

膜剥離

一次抗体検出中に、ＰＶＤＦ膜を剥離し、総タンパク質量の添加コントロールとして用いたＧＡＰＤＨを検出した。Ｍｉｌｌｉ－Ｑ　Ｈ２Ｏ中に０．０２Ｍ　Ｔｒｉｓ、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、２％ＳＤＳ及び１００ｍＭβメルカプトエタノールを含む剥離緩衝剤でＰＶＤＦ膜を２回洗浄した。膜を緩衝剤と一緒に５５℃で３０分間激しく撹拌し、さらにＴＢＳ－ｔｗｅｅｎと一緒に室温で１５、２０及び３０分間の３回激しく撹拌して洗浄した。ＰＶＤＦ膜をＴＢＳ－ｔｗｅｅｎ中の５％脱脂乳を用いて室温で１時間ブロックし、ＨＲＰ複合αＧＡＰＤＨ抗体の１：２０，０００希釈を用いてＧＡＰＤＨを検出した。

【０３１３】

遺伝子発現の定量分析

ＲＮＡ抽出

ＴＲＩ試薬（登録商標）を用いて凍結させた細胞を解凍し、室温で５分間インキュベートした。細胞収集に用いたＴＲＩ試薬（登録商標）各１ミリリットルにクロロホルム２００μＬを添加した。試料を１分間激しく振とうし、室温で３分間静置した。次いで、試料を１６，０００ｇ、４℃で１５分間遠心分離した。

【０３１４】

ＲＮＡ抽出をＲＮｅａｓｙ（登録商標）ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて製造者の指示に従って実施した。上方の水相を新しい管に移し、ＲＮａｓｅを含まないH_2Oで希釈した７０％エタノールと等体積で混合した。試料７００μＬをＲＮｅａｓｙ（登録商標）精製カラム（Ｑｉａｇｅｎ）に移し、１６，０００ｇで２０秒間遠心分離した。遠心分離後、通過画分を廃棄し、残りの試料／エタノール混合物をカラムに充填し、１６，０００ｇで２０秒間遠心分離した。ＲＷ１緩衝剤３５０μＬをピペットでスピンカラム膜に取り、カラムを１６，０００ｇで１５秒間遠心分離した。

【０３１５】

製造者（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）の指示に従って、試料をＤＮＡｓｅＩで処理して、ゲノムＤＮＡを除去した。ＤＮＡｓｅＩ原液を緩衝剤ＲＤＤで１：７希釈し、そのうちＤＮＡｓｅＩ溶液８０μＬを次いでスピンカラム膜に直接塗布し、室温で１５分間インキュベートした。

【０３１６】

更なる緩衝剤ＲＷ１　３５０μＬをカラム上に添加し、１６，０００ｇで１５秒間遠心分離し、続いてＲＰＥ緩衝剤５００μＬを用いて２回洗浄した。残りの緩衝剤を除去するために、カラムを１６，０００ｇで２分間遠心分離し、１６，０００ｇで更に１分間遠心分離した。ＲＮａｓｅを含まないＨ２Ｏ　５０μＬをスピンカラム膜に直接塗布し、続いて１６，０００ｇで１分間遠心分離して各試料の溶出を行った。溶出ＲＮＡ試料を－８０℃で貯蔵した。

【０３１７】

抽出ＲＮＡの濃度をＮａｎｏＤｒｏｐ（商標）２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｕｓｔｒａｌｉａ Ｐｔｙ Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）を用いて２６０ｎｍで測定した。２６０／２８０ｎｍ及び２６０／２３０ｎｍの各比を測定して、試料にタンパク質及びＤＮＡ混入がないことを確認した。１．６より大きい比は、試料が汚染されていないことを示す。

【０３１８】

ｃＤＮＡ合成

ｑＲＴ－ＰＣＲ用の相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）をＨｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ＲＮＡ－ｔｏ－ｃＤＮＡキット（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて製造者の指示に従って調製した。ＲＮＡ２μｇを含む反応物２０μＬの場合、主混合緩衝剤１０μＬ及び逆転写酵素１μＬを添加し、ＲＮａｓｅを含まないH_2Oで体積を２０μＬにした。ＤＮＡ Ｅｎｇｉｎｅ（登録商標）ペルチェサーマルサイクラー（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｐｔｙ，Ｌｔｄ．、ニューサウスウェールズ、オーストラリア）を用いて増幅を行った。反応混合物を３７℃で１時間、続いて９５℃で５分間インキュベートし、次いで４℃に冷却した。ｃＤＮＡ試料を必要になるまで－２０℃で貯蔵した。

【０３１９】

プライマー設計

下表２．４に詳述したプライマー配列を文献、Ｈａｒｖａｒｄ ＰｒｉｍｅｒＢａｎｋから得た、又はＮＣＢＩ Ｐｒｉｍｅｒ ＢＬＡＳＴを用いて設計した。Ｈａｒｖａｒｄ ＰｒｉｍｅｒＢａｎｋから選択されたプライマーは、最終アンプリコンサイズが１５０塩基対未満であり、その融解温度が約６０℃であり、可能であれば、エキソン－エキソン接合部にわたる範囲であるという判定基準に基づいて選択された。Ｐｒｉｍｅｒ－ＢＬＡＳＴを用いて設計されたプライマーもこれらの判定基準に基づいた。オリゴヌクレオチドをＧｅｎｅＷｏｒｋｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ、南オーストラリアから購入した。

【０３２０】

定量的ＲＴ－ＰＣＲ

５μＬのＰｏｗｅｒ ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、各０．５μＬの１０ｎＭ順方向及び逆方向プライマー、ＤＥＰＣ処理Ｈ２Ｏで１：２５希釈されたｃＤＮＡ試料２μＬを含み、ＤＥＰＣ処理Ｈ２Ｏ２μＬで１０μＬにした、反応混合物１０μＬを準備した。反応物を３つ組で９６ウェルプレート（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上で培養した。各プレートは、反応効率を制御するために、標的遺伝子と内在性遺伝子の検量線のための（ＬＮＣａＰ細胞株由来の）基準ｃＤＮＡ試料の段階希釈物を含んだ。

【０３２１】

７５００Ｆａｓｔ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）とＡＢＩ７５００ソフトウェアｖ２．０．２を用いてｑＰＣＲを実施した。

すべての標的のサイクリング条件は、酵素を活性化し、ｃＤＮＡを変性させるために５０℃で２分間、９５℃で１０分間、続いて９５℃で１５秒の変性ステップと６０℃で６０秒の伸長及び信号取得ステップを４０サイクルであった。各実行後に溶融曲線を作成して、プライマー二量体又は生成物及び他の混入物がないことを確認した。

【０３２２】

サイクルしきい値（C_T：ｃｙｃｌｅ ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を増殖の対数期におけるしきい値レベル０．３５で、かつベースラインノイズよりも上にした。各試料からの遺伝子発現の相対量を、段階希釈標準材料から作成された検量線に対するC_T値の計算によって導出した。希釈標準からプロットした傾向直線の傾きから計算した反応効率は、９０から１１０％であった。各標的を単一プレート上で３つ組で評価し、３つ組の生物学的複製を独立に実施した。平均遺伝子発現量を各複製プレート上のｍＲＮＡ量から導出した。各単一のプレートは、複製ウェルからの平均C_T及びｍＲＮＡレベルを与えた。

【０３２３】

【表４】

表５　ｑＰＣＲに用いたプライマー配列

遺伝子		配列(5' - 3')	GeneBank ID (NM_)	プライマー位置	供給源
GAPDH	F	TGCACCACCAACTGCTTAGC (SEQ ID NO. 14)	002046.3	556 – 575	{Sardiello, 2009}
	R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG (SEQ ID NO. 15)		642 – 622	
LAMP1	F	ACGTTACAGCGTCCAGCTCAT (SEQ ID NO. 16)	005561.3	608 – 628	{Sardiello, 2009 }
	R	TCTTTGGAGCTCGCATTGG (SEQ ID NO. 17)		685 – 667	
SCARB2 (LIMP-2)	F	AAAGCAGCCAAGAGGTTCC (SEQ ID NO. 18)	005506.3	1488 – 1506	Primer-BLAST
	R	GTCTCCCGTTTCAACAAAGTC (SEQ ID NO. 19)		1556 – 1536	
TFRC	F	GGCTACTTGGGCTATTGTAAAGG (SEQ ID NO. 20)	003234.2	250 – 272	PrimerBank
	R	CAGTTTCTCCGACAACTTTCTCT (SEQ ID NO. 21)		405 – 383	
TFR2	F	CGTGCGGAGACTCTGTGTT (SEQ ID NO. 22)	003227.3	329 – 347	PrimerBank
	R	ATCCAGGTCAGGCTCATAGTT (SEQ ID NO. 23)		387 – 367	
APPL1	F	ACTTGGGTACATGCAAGCTCA (SEQ ID NO. 24)	012096.2	747 – 767	PrimerBank
	R	TCCCTGCGAACATTCTGAACG (SEQ ID NO. 25)		863 – 843	
APPL2	F	AGCTGATCGCGCCTGGAACG (SEQ ID NO. 26)	018171.3	1543 – 1562	Primer-BLAST
	R	GGGTTGGTACGCCTGCTCCCT (SEQ ID NO. 27)		1636 – 1616	
EEA1	F	CCCAACTTGCTACTGAAATTGC (SEQ ID NO. 28)	003566.3	497 – 518	PrimerBank
	R	TGTCAGACGTGTCACTTTTTGT (SEQ ID NO. 29)		591 – 570	
RAB5A	F	AGACCCAACGGGCCAAATAC (SEQ ID NO. 30)	004162.4	22 – 41	PrimerBank
	R	GCCCCAATGGTACTCTCTTGAA (SEQ ID NO. 31)		164 – 143	
RABEP1 (Rabaptin5)	F	ATTAAGGCGATTGCCACAGTC (SEQ ID NO. 32)	004703.4	486 – 506	PrimerBank
	R	TGGTGCTCATAGTCACGAACT (SEQ ID NO. 33)		616 – 596	
RAB4A	F	GGGGCTCTCCTCGTCTATGAT (SEQ ID NO. 34)	004578.2	470 – 490	PrimerBank
	R	AGCGCATTGTAGGTTTCTCGG (SEQ ID NO. 35)		519 – 499	
RAB11	F	CAACAAGAAGCATCCAGGTTGA (SEQ ID NO. 36)	004663.4	146 – 167	PrimerBank
	R	GCACCTACAGCTCCACGATAAT (SEQ ID NO. 37)		260 – 239	
RAB25	F	TCGGCGAATCAGGTGTGGGGA (SEQ ID NO. 38)	020387.2	279 – 299	Primer-BLAST
	R	ATGGTGGTGCGGCTGTCGTG (SEQ ID NO. 39)		360 – 341	
RAB7A	F	GTGTTGCTGAAGGTTATCATCCT (SEQ ID NO. 40)	004637.5	19 – 41	PrimerBank
	R	GCTCCTATTGTGGCTTTGTACTG (SEQ ID NO. 41)		128 – 106	
RAB9	F	CCTCATTGCGCCCAGACGGG (SEQ ID NO. 42)	004251.4	108 – 127	Primer-BLAST
	R	AGTGCAAGAGTGTCTCGCGGC (SEQ ID NO. 43)		181 – 161	

【０３２４】

共焦点顕微鏡検査法
免疫蛍光標識化
固定細胞を５％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ：ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ）ＰＢＳ溶液中でゆっくり撹拌しながら室温で２時間インキュベートすることによって非特異抗体反応性を低下させた。次いで、細胞を、５％ＢＳＡで希釈した適切な濃度の一次抗体（表２．３）と一緒に室温で２時間インキュベートし、続いて二次抗体と室温で１時間インキュベートした。結合していない抗体をＰＢＳで３回洗浄して除去し、ＤＡＰＩ核染色を含むＰｒｏＬｏｎｇ（登録商標）Ｇｏｌｄ　Ａｎｔｉｆａｄｅ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と一緒にカバーガラスを１ｍｍ顕微鏡スライド上に載せた。

【０３２５】
画像収集及び処理
共焦点顕微鏡法をＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ７１０ＭＥＴＡ　ＮＬＯレーザー走査顕微鏡（南オーストラリア大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｓｏｕｔｈ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）、オーストラリア）及び付属のＣａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｚｅｎ２００９ソフトウェアを用いて実施した。３７０、４８８、５４３及び６３３ｎｍのレーザー線をＤＡＰＩ、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８、Ｃｙ３及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６３３蛍光に利用した。レーザー強度を蛍光標的に応じて５％から２５％に設定した。蛍光団間の信号のクロスオーバーを除去するために、各チャネル間のギャップ２０ｎｍで発光蛍光をフィルターにかけた。各チャネルを４ライン平均の面順次走査によってピクセル滞留時間３．１５μｓでキャプチャーした。各レーザーのピンホール直径を１エアリー単位に設定した。細胞を絞り１．４の６３ｘ油浸対物レンズで観察し、２ｘ光学ズームを用いた。画像を分解能１０２４ｐｘ２、１６ビットグレースケール深さでキャプチャーした。画像キャプチャー分解能１０２４ピクセル及びレンズ／ズーム比に基づいて、各画素は、寸法０．０６６μＭに相当する。少なくとも４個の細胞を各カバーガラス上で無作為に選択し、代表的画像を作図のために処理した。画像をグレースケール１６ビットＴＩＦＦファイルとしてエクスポートし、Ａｄｏｂｅ（登録商標）Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐ（登録商標）ＣＳ５（Ａｄｏｂｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．、サンホゼ、カリフォルニア、米国）を用いて更に処理した。

【０３２６】
細胞内輸送及びエンドサイトーシスの可視化
ＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）陽性小胞を生細胞共焦点顕微鏡法によって可視化して、固定細胞において生じ得るＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）の漏出を防止した。細胞をＤＫＳＨ疎水性チャンバスライド（ＤＫＳＨオーストラリアＰｔｙ　Ｌｔｄ．、ビクトリア、オーストラリア）中で標準状態で培養した。続いて、ＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）を培地で１／２００希釈し、細胞に添加した。３７℃で５分間インキュベーション後、細胞培養物を可視化した。

【０３２７】
トランスフェリンエンドサイトーシスアッセイを本明細書に詳述した通常状態で培養した細胞に実施した。４８時間後、トランスフェリン６３３複合物の１／１０００希釈物を含む新しい培地で培地を置換した。細胞を５、１５又は３０分間インキュベートし、その後、培地を吸引し、細胞をｄＰＢＳで短時間洗浄し、４％ＰＦＡで固定した。固定細胞を５％ＢＳＡで２時間ブロックした後、ファロイジン４８８複合物と一緒に９０分間インキュベートした。結合していない抗体をＰＢＳで３回洗浄して除去し、ＤＡＰＩ核染色を含むＰｒｏＬｏｎｇ（登録商標）Ｇｏｌｄ　Ａｎｔｉｆａｄｅ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）と一緒にカバーガラスを１ｍｍ顕微鏡スライド上に載せた。

【０３２８】
トランスフェリンとエンドソームマーカーの共蛍光
細胞を本明細書に詳述した通常状態でインキュベートした。４８時間後、トランスフェリン６３３複合物の１／１０００希釈物を含む新しい培地で培地を置換した。細胞をトラ

ンスフェリン６３３培地と一緒に２０分間インキュベートした。続いて、培地を吸引し、ｄＰＢＳで短時間洗浄し、固定し、透過処理した。一次及び二次抗体による標識化は、本明細書に詳述したように進行した。

【０３２９】

公開前立腺癌コホート

テイラーコホートは、メモリアル　スローン　ケタリングがんセンター（ＭＳＫＣＣ）において前立腺全摘出術による治療を受けた患者からなり、１５０個の前立腺癌及び２９個の非悪性組織のプロファイリングをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｈｕｍａｎ　Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイを用いて実施した。データをｃＢｉｏ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ｐｏｒｔａｌから得た。チャンドラン（Ｃｈａｎｄｒａｎ）コホートは、１８個の正常組織、６５個の一次組織、２５個の転移性組織及び６３個の正常な隣接非悪性組織で構成される。これらの組織の発現プロファイリングをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｕ９５Ａｖ２ヒト遺伝子アレイを用いて行った。データをＮＣＢＩ　ＧＥＯ（受託番号ＧＳＥ６９１９）から取得した。トムリンスによるコホートをＮＣＢＩ　ＧＥＯ（受託番号ＧＳＥ６０９９）から取得した。トムリンスによるコホートは、３２個の一次組織試料、２０個の転移性組織試料、１３個の前立腺上皮内腫よう（ＰＩＮ）組織試料及び２７個の正常組織試料で構成される。チナイヤンヒト２０Ｋ　Ｈｓ６アレイを用いて前もって試料の分析を行った。ＭＳＫＣＣからの追加のコホートであるグリンスキーコホートは、７９個の悪性前立腺組織で構成され、前立腺癌の生化学的再発（ＢＣＲ）を評価するのに使用される１０６か月までの臨床経過観察データを含む。これは、ＰＳＡレベル≧０．２ｎｇ／ｍＬで規定される２９名のＢＣＲ患者及び５０名の悪化のない患者を含む。

【０３３０】

正常組織と前立腺癌組織の間の統計解析を、ウェルチの補正を含む両側独立ｔ検定によって実施した。チャンドラン及びトムリンスコホートにおける複数の群の発現差を評価するために、ダンの多重比較検定を含むクラスカル　ワリスを実施した。グリンスキーコホートからのデータをウェルチの補正を含む両側独立ｔ検定によって分析して、グリーソン等級３群と４群の差を求めた。Ｋ平均クラスタリングをＳｔａｔａ／ＳＥ　ｖ１１．２（Ｓｔａｔａ　Ｃｏｒｐ　ＬＰ、テキサス、米国）を用いて実施して、高及び低遺伝子発現群を決定し、ゲーハンーブレスローウィルコクソン検定によりカプラン　マイヤー生存曲線を用いて評価して、曲線間の差を求めた。すべての統計的検定をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　５．０３（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｉｎｃ．、カリフォルニア、米国）を用いて行った。

【０３３１】

実施例６－ＡＰＰＬ１及びＲＡＢ７に対する抗体の産生

１５個のアミノ酸の長さを有するエピトープを、ヒトＡＰＰＬ１又はＲＡＢ７のタンパク質配列に対する抗体の合成後の検出に適した強い抗原性を有すると予測されたこれらの特異的配列から選択した。

ＡＰＰＬ１：

エピトープ＃１位置１４５～１５９（ヒト）：ＮＲＹＳＲＬＳＫＫＲＥＮＤＫＶ（配列番号７）。

エピトープ＃２位置２６５～２７９（ヒト）：ＤＰＤＰＴＫＦＰＶＮＲＮＬＴＲ（配列番号８）。

エピトープ＃３位置６９１～７０５（ヒト）：ＳＱＳＥＥＳＤＬＧＥＧＧＫＫＲ（配列番号９）。

ＲＡＢ７：

エピトープ＃１位置１０３～１１７（ヒト）：ＲＤＥＦＬＩＱＡＳＰＲＤＰＥＮ（配列番号１０）。

エピトープ＃２位置１２４～１３８（ヒト）：ＧＮＫＩＤＬＥＮＲＱＶＡＴＫＲ（配列番号１１）。

エピトープ＃３位置１８３～１９７（ヒト）：ＹＮＥＦＰＥＰＩＫＬＤＫＮＤＲ（配列

番号１２）。
【０３３２】
ペプチドを合成し、ウサギを免疫してポリクローナル抗体の産生に用いた。
【０３３３】
図２３Ａは、Ａｐｐｌ１組換えタンパク質に対するウサギ抗Ａｐｐｌ１ポリクローナル抗体の親和性を示す。図２３Ｂは、Ｒａｂ７組換えタンパク質に対するウサギ抗Ｒａｂ７ポリクローナル抗体の親和性を示す。上で詳述したペプチドに対して産生されるポリクローナル抗体の親和性を、精製ＡＰＰＬ１又はＲＡＢ７タンパク質に表面プラズモン共鳴（ＢｉａＣｏｒｅ　Ｔ１００）を用いて測定した。結果を図２３に示す。Ａｐｐｌ１＃２（図２３Ａ）及びＲａｂ７＃３（図２３Ｂ）の親和性が最も高く、洗浄後の結合及び親和性が最も大きく、これらが、下流のアッセイにおいてそのそれぞれのタンパク質よりも結合し、ＤＥＬＦＩＡ及びサンドイッチＥＬＩＳＡ用の捕捉抗体として適していることを示唆している。Ａｐｐｌ１＃３及びＲａｂ７＃１は、精製タンパク質に対して良好な親和性を示し、そのそれぞれの標的タンパク質の検出のためにＤＥＬＦＩＡアッセイに使用されるユウロピウム標識化に適している。
【０３３４】
図２４Ａは、直接ＤＥＬＦＩＡアッセイにおいてＲａｂ７タンパク質用の（エピトープ＃１に対する）ユウロピウム標識ウサギ抗Ｒａｂ７ポリクローナル抗体の検量線である。標識抗体３．９ｍＬが０．１３ｍｇ／ｍＬ（全Ａｂ０．５１ｍｇ）で前もって得られ、近似ユウロピウム標識収率は１．６であった。図２４Ｂは、直接ＤＥＬＦＩＡアッセイにおけるＡｐｐｌ１タンパク質用の（エピトープ＃３に対する）ユウロピウム標識ウサギ抗Ａｐｐｌ１ポリクローナル抗体の検量線である。標識抗体４．８ｍＬが０．１１ｍｇ／ｍＬ（全Ａｂ０．５３ｍｇ）で前もって得られ、近似ユウロピウム標識収率は３．８であった。
【０３３５】
実施例７－追加のマーカーの診断及び予後値
（ｉ）癌進行中のエンドソーム関連遺伝子発現の変化
エンドソーム関連ｍＲＮＡ転写物の発現を、原発性癌及び非悪性組織に加えて前立腺上皮内腫よう（ＰＩＮ）及び転移性癌組織の分析が可能なトムリンスコホートから分析した。
【０３３６】
データを図２５のトムリンスらによるコホート由来のリソソーム遺伝子発現データの垂直散布図に示す。前立腺癌組織の分析によって、前立腺癌進行中に遺伝子発現が変化することが明らかになった。２７個の非悪性組織、１３個の前立腺上皮内腫よう、３２個の原発性前立腺癌及び２２個の転移性癌組織試料のチナイヤンヒト２０Ｋ　Ｈｓ６アレイ由来の発現プロファイリングデータ（トムリンスら２００７年）を定量して、エンドソーム関連遺伝子の相対発現量を示した。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１）。
【０３３７】
トムリンスコホートにおけるＭ６ＰＲ及びＩＧＦ２Ｒ及びＳＴＥＡＰ４の遺伝子発現は、正常、ＰＩＮ、原発性又は転移性癌組織間で有意な変化はなかった。ＭＹＯ１Ｂ、ＡＬＩＸ及びＳＤＣＢＰは、前立腺癌組織において転移性組織とは異なる発現を示した（Ｐ≦０．０１）。ＰＩＮと転移性組織間の発現の有意な減少が、ＭＹＯ１Ｂ（Ｐ≦０．００１）及びＰＤＣＤ６ＩＰ（Ｐ≦０．０１）で認められたが、ＳＤＣＢＰでは認められなかった。ＭＹＯ１Ｂの発現は、ＰＩＮ組織において非悪性前立腺組織よりも有意に増加した（Ｐ≦０．０１）。
【０３３８】
（ｉｉ）生化学的再発リスクのある患者を層別化するエンドソーム関連遺伝子の予知可能性
エンドソーム関連遺伝子の発現の予知可能性を評価するために、本発明者らは、遺伝子

発現に基づくＫ平均クラスタリングを利用して、グリンスキーコホート由来の患者を２つの群に分類した。グリンスキーコホートマイクロアレイは、生検時に検出される初期ＰＳＡレベルのデータ、及び治療後の再発についての情報を提供する。

【０３３９】

図２６は、エンドソーム／リソソーム関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析、及び生化学的再発（ＢＣＲ）に基づく患者の層別化を示す。ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ及びＰＤＣＤ６ＩＰの遺伝子発現によって、患者を予後リスク群に層別化した。グリンスキーコホート（グリンスキーら２００４年）由来の患者を、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦ２Ｒ、ＳＯＲＴ１、ＳＴＥＡＰ４、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１及びＳＤＣＢＰ遺伝子発現の量（高－黒線、低－灰色線）に基づくＫ平均クラスタリングによって２つの群に層別化した（高－黒線、低－灰色線）。解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。ＢＣＲ：生化学的再発、ＨＲ：危険率、ＣＩ：信頼区間。

【０３４０】

高（黒線）又は低（灰色線）ＳＯＲＴ１及びＭＹＯ１Ｂ遺伝子発現のクラスタリングによって、高発現患者は生化学的再発（ＢＣＲ）リスクが有意に増加したことが明らかになった（それぞれＰ≦０．０１及びＰ≦０．０５）。より少量のＰＤＣＤ６ＩＰを発現する患者は、ＢＣＲリスクが有意に高かった（Ｐ≦０．０５）。Ｍ６ＰＲ、ＳＴＥＡＰ４、ＳＤＣ１及びＳＤＣＢＰ遺伝子の高又は低発現による分類は、患者を予後群に有意に層別化しなかったが、ＩＧＦ２Ｒでは傾向が認められた（Ｐ＝０．０９６）。付随する表は、エンドソーム／リソソーム関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析、及び生化学的再発（ＢＣＲ）に基づく患者の層別化を示す。ＳＯＲＴ１、ＭＹＯ１Ｂ及びＰＤＣＤ６ＩＰの遺伝子発現によって、患者を予後リスク群に層別化した。グリンスキーコホート（グリンスキーら２００４年）由来の患者を、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦ２Ｒ、ＳＯＲＴ１、ＳＴＥＡＰ４、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１及びＳＤＣＢＰ遺伝子発現の量（高－黒線、低－灰色線）に基づくＫ平均クラスタリングによって２つの群に層別化した（高－黒線、低－灰色線）。解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。

【０３４１】

（ｉｉｉ）ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／を発現する患者におけるエンドソーム関連遺伝子の予知可能性

図２７は、≦７．８ｎｇ／ｍＬ　ＰＳＡを発現する癌患者のリソソーム遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存分析及び多変量解析を示す図である。リソソーム関連遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、ＩＧＦ２Ｒ、ＳＯＲＴ１又はＰＤＣＤ６ＩＰ発現に基づいて≦７．８ｎｇ／ｍＬ　ＰＳＡを発現する患者における有意な予知可能性を示した。ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの予後良好亜群から、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦ２Ｒ、ＳＯＲＴ１、ＳＴＥＡＰ４、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣ１及びＳＤＣＢＰの遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって患者を更に２つの群に層別化した（高発現－黒線、低発現－灰色線）。統計解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。ＢＣＲ：生化学的再発、ＨＲ：危険率、ＣＩ：信頼区間。

【０３４２】

ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの患者を高遺伝子発現群と低遺伝子発現群に層別化すると、ＩＧＦ２Ｒ（Ｐ≦０．０１）、ＳＯＲＴ１（Ｐ≦０．０１）又はＡＬＩＸ（Ｐ≦０．０５）の発現の増加によってＢＣＲリスクが有意に増加することが明らかになった（図２７）。Ｍ６ＰＲ及びＳＤＣ１の低発現並びにＭＹＯ１Ｂのより高い発現は、低ＰＳＡを発現するリスク患者を層別化する傾向があった。ＳＴＥＡＰ４又はＳＤＣＢＰの発現は、低レベルのＰＳＡを発現する患者の予知可能性を示すようには見えなかった。

【０３４３】

（ｉｖ）シンタキシン７（ＳＴＸ７）及びシンタキシン１２（ＳＴＸ１２）の遺伝子発現は、前立腺癌組織において有意に減少する。

テイラーコホート由来の前立腺癌組織におけるシンタキシン７及びシンタキシン１２ｍＲＮＡ転写物の発現を非悪性組織と比較して分析した。

【０３４４】
図２８のパネルＡは、シンタキシン７及びシンタキシン１２の遺伝子発現の変化率を示す箱ひげグラフである。パネルＢは、トムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。パネルＡは、１５０個の原発性前立腺癌及び２９個の非悪性組織のＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｈｕｍａｎ　Ｅｘｏｎ１．０ＳＴアレイ由来の発現プロファイリングデータ（テイラー２０１０年）を定量して、ＳＴＸ７及びＳＴＸ１２の遺伝子発現率変化を示したものである。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。パネルＢは、前立腺癌組織の分析によって、前立腺癌進行中にＳＴＸ７遺伝子発現が変化することが明らかになったことを示す。２７個の非悪性組織、１３個の前立腺上皮内腫よう、３２個の原発性前立腺癌及び２２個の転移性癌組織試料のチナイヤンヒト２０Ｋ　Ｈｓ６アレイ由来の発現プロファイリングデータ（トムリンスら２００７年）を定量して、エンドソーム関連遺伝子の相対発現量を示した。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦０．０５）。

【０３４５】
原発性癌組織におけるＳＴＸ７（Ｐ≦０．０１）及びＳＴＸ１２（Ｐ≦０．０００１；図２８Ａ）の発現は、非悪性組織よりも統計的に有意に減少した。トムリンスコホート由来の前立腺癌進行中のＳＴＸ７遺伝子発現の分析によれば、転移性組織の遺伝子発現が原発性癌組織よりも有意に減少した（Ｐ≦０．０５；図２８Ｂ）。

【０３４６】
（ｖ）生化学的再発リスクのある患者を層別化するシンタキシン７及び１２の予知可能性
シンタキシン７及び１２遺伝子発現の発現の予知可能性を評価するために、本発明者らは、遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングを利用して、グリンスキーコホート由来の患者を２つの群に分類した。

【０３４７】
図２９は、シンタキシン７及びシンタキシン１２遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す。（Ａ）リソソーム関連遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、ＳＴＸ１２発現に基づく有意な予知可能性を示した。（Ｂ）ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの「予後良好」亜群から、ＳＴＸ７及びＳＴＸ１２の遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって患者を更に２つの群に層別化した（高発現－黒線、低発現－灰色線）。統計解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。ＢＣＲ：生化学的再発、ＨＲ：危険率、ＣＩ：信頼区間。

【０３４８】
高（黒線）又は低（灰色線）ＳＴＸ１２遺伝子発現のクラスタリングによって、低発現患者は生化学的再発（ＢＣＲ）リスクが有意に増加したことが明らかになったが（Ｐ≦０．０１）、ＳＴＸ７の予知能力はなかった（図２９Ａ）。ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの患者を高遺伝子発現群と低遺伝子発現群に層別化すると、ＳＴＸ１２の発現の減少によってＢＣＲのリスクが有意に増加することが明らかになったが（Ｐ≦０．０５）（図２９Ｂ）、ＳＴＸ７に患者を層別化する能力はなかった。

【０３４９】
（ｖｉ）エンドソーム関連機構の細胞内量ではない分泌量は、前立腺癌細胞において有意に変化する。

【０３５０】
ウエスタンブロット法を使用して、非悪性前立腺細胞株（ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２）及び前立腺癌細胞株（２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ）由来の細胞溶解物及び培地におけるＡＬＩＸ、シンデカン－１及びソルチリン－１の量を規定した。図３０は、細胞内及び分泌エンドソーム関連タンパク質の検出及び定量化を示す。（Ａ）３つ組で検査した非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに癌細胞株２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ由来の細胞抽出物（Ａ；全細胞溶解物１０μｇ）及び培地（Ｂ；

コンフルエントな細胞と一緒に４８時間インキュベーション後に収集し、細胞数を補正した培養物３ｍＬ）におけるエンドソーム関連タンパク質／ＧＡＰＤＨのウエスタンブロット分析の代表的画像。

【０３５１】

ウエスタンブロット法を使用して、非悪性前立腺細胞株（ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２）及び前立腺癌細胞株（２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ）由来の細胞溶解物及び培地におけるＡＬＩＸ、シンデカン－１及びソルチリン－１の量を規定した。癌細胞におけるこれらのタンパク質の細胞内量は、非悪性細胞と変わらなかったが（図３０Ａ、Ｃ）、前立腺癌由来の培地において検出されたＡＬＩＸ量は、非悪性コントロール細胞株に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０１；図３０Ｃ、Ｄ）。シンデカン－１及びソルチリン－１は、前立腺癌細胞株由来の培地において、非悪性細胞に比べて有意に減少したレベルで検出された（Ｐ≦０．０１）。

【０３５２】

（ｖｉｉ）ＦＧＦ１遺伝子発現は、前立腺癌組織において減少する。

図３１は、ＦＧＦ１の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊Ｐ≦０．０１）。

【０３５３】

マイクロアレイにおけるＦＧＦ１遺伝子発現の分析は、グラソーコホートにおいて統計的に有意な減少を示した（Ｐ≦０．０１）。テイラーコホートにおいて減少の証拠があったが、これは統計的に有意でなかった。トムリンスコホート由来のＦＧＦ１の発現は、組織病期の間で変わりやすかった。

【０３５４】

（ｖｉｉｉ）ＦＧＦ２遺伝子発現は、前立腺癌組織において減少する。

図３２は、ＦＧＦ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１）。

【０３５５】

マイクロアレイにおけるＦＧＦ２遺伝子発現の分析は、テイラーコホートとグラソーコホートの両方において統計的に有意な減少を示した（Ｐ≦０．０００１）。トムリンスコホート由来の組織タイプの可変性は、コホートにおけるこの遺伝子の利用可能なデータが限られていることに起因した可能性がある。

【０３５６】

（ｉｘ）ＦＧＦ３遺伝子発現は、前立腺癌組織において減少する。

図３３は、ＦＧＦ３の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。箱ひげグラフをテューキー異常値（黒点）と一緒にプロットした。統計的有意性をアステリスクで示す（＊Ｐ≦０．０５）。

【０３５７】

マイクロアレイにおけるＦＧＦ３遺伝子発現の分析は、テイラーコホートにおける有意な増加を示したが（Ｐ≦０．０５）、グラソーコホートにおけるＦＧＦ３発現に有意な増加はなかった。

【０３５８】

（ｘ）ＦＧＦ２のカプラン　マイヤー分析は、ＦＧＦ２発現のより低い患者における再発リスクの増加傾向を示唆している。

図３４は、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２及びＦＧＦ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す。ＦＧＦ関連遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、ＦＧＦ２発現に基づく幾

らかの潜在的予知可能性を示した。

【０３５９】

ＦＧＦ関連遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、ＦＧＦ２発現に基づく幾らかの予知可能性を示したが、これは統計的に有意でなかった。患者は、「高」又は「低」ＦＧＦ１又はＦＧＦ３群に層別化されなかった。

【０３６０】

（ｘｉ）ＦＧＦ関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析は、ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬを発現する患者における予後値を示した。

図３５は、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２及びＦＧＦ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す。ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの「予後良好」亜群から、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２及びＦＧＦ３の遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって患者を更に２つの群に層別化した（高発現－黒線、低発現－灰色線）。統計解析をゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定によって実施した。ＢＣＲ：生化学的再発、ＨＲ：危険率、ＣＩ：信頼区間。

【０３６１】

ＦＧＦ遺伝子の高（黒線）又は低（灰色線）遺伝子発現のクラスタリングによって、ＦＧＦ２又はＦＧＦ３発現の少ないＰＳＡタンパク質の発現が少ない患者は生化学的再発リスクが有意に増加したことが明らかになったが（Ｐ≦０．０５）、ＦＧＦ１の明白な予知能力はなかった。

【０３６２】

（ｘｉｉ）ＦＧＦＲ１遺伝子発現は、前立腺癌組織において減少する。

図３６は、ＦＧＦＲ１の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１）。

【０３６３】

マイクロアレイにおけるＦＧＦＲ１遺伝子発現の分析は、テイラー及びグラソーコホートにおいて統計的に有意な前立腺癌組織の減少を示した（Ｐ≦０．０００１）。組織タイプ全体にわたって、非悪性組織に比べてＰＩＮ組織が減少し、ＰＩＮと転移性組織の間の遺伝子発現が統計的に有意に増加した（Ｐ≦０．０１）。

【０３６４】

（ｘｉｉｉ）ＦＧＦＲ２遺伝子発現は、前立腺癌組織において有意に減少する。

図３７は、ＦＧＦＲ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊＊ｐ≦０．００１）。

【０３６５】

マイクロアレイにおけるＦＧＦＲ２遺伝子発現の分析は、テイラー及びグラソーコホートにおいて統計的に有意な前立腺癌組織の減少を示した（Ｐ≦０．０００１）。組織タイプ全体にわたって、非悪性組織に比べてＰＩＮ組織及び転移性組織が減少し、トムリンスコホートにおける非悪性組織よりも原発性癌組織における遺伝子発現が統計的に有意に減少した（Ｐ≦０．００１）。

【０３６６】

（ｘｉｖ）ＦＧＦＲ３遺伝子発現は、前立腺癌組織において有意に減少する。

図３８は、ＦＧＦＲ３の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。

【０３６７】

マイクロアレイにおけるＦＧＦＲ３遺伝子発現の分析によれば、前立腺癌組織におけるＦＧＦＲ３発現は非悪性前立腺組織に比べて有意な変化がなかった。ＦＧＦＲ３の発現は、各病態においてトムリンスコホートにおける正常組織に比べて減少した証拠を示したが

、これは統計的に有意でなかった。

【０３６８】

（ｘｖ）ＦＧＦＲ関連遺伝子のカプラン　マイヤー分析は、発現する患者における予後値を示した。

図３９は、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２及びＦＧＦＲ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す。グリンスキーコホート由来のＦＧＦＲ関連遺伝子発現のカプラン　マイヤー分析は、ＦＧＦＲ２又はＦＧＦＲ３発現に基づく幾らかの潜在的予知可能性を示した。

【０３６９】

ＦＧＦＲ遺伝子の高（黒線）又は低（灰色線）遺伝子発現のクラスタリングによって、ＦＧＦＲ２又はＦＧＦＲ３遺伝子発現の少ない患者は、より多量のＦＧＦＲ２又はＦＧＦＲ３を発現する患者に比べて生化学的再発リスクが有意に増加したことが明らかになった（Ｐ≦０．０５）。このデータセットではＦＧＦＲ１を発現する患者の有意な層別化はなかった。

【０３７０】

（ｘｖｉ）ＦＧＦＲ３のカプラン　マイヤー分析は、ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬを発現する患者における予後値を示した。

図４０は、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２及びＦＧＦＲ３遺伝子発現のカプラン　マイヤー生存率分析を示す。ＰＳＡ≦７．８ｎｇ／ｍＬの「予後良好」亜群から、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２及びＦＧＦＲ３の遺伝子発現に基づくＫ平均クラスタリングによって患者を更に２つの群に層別化した（高発現－黒線、低発現－灰色線）。統計解析をゲーハンーブレスローウィルコクソン検定によって実施した。ＢＣＲ：生化学的再発、ＨＲ：危険率、ＣＩ：信頼区間。

【０３７１】

ＦＧＦＲ遺伝子の高（黒線）又は低（灰色線）遺伝子発現のクラスタリングによって、ＦＧＦＲ３発現の少ないＰＳＡタンパク質の発現が少ない患者は生化学的再発リスクが有意に増加したことが明らかになった（Ｐ≦０．００１）。生化学的再発リスクの増加を示唆するＦＧＦＲ２発現の減少傾向があった。群を高又は低ＦＧＦＲ１発現にクラスタリングする患者の層別化は成されなかった。

【０３７２】

（ｘｖｉｉ）ＮＯＸ２タンパク質は、前立腺癌細胞において有意に増加する。

図４１は、非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来のＮＯＸ２タンパク質（６５（５６）＆３０ｋＤａ）の検出及び定量化を示す図である。３つ組で検査した非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに癌細胞株２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ由来の（Ａ）全細胞溶解物１０μｇ及び（Ｂ）分泌ＮＯＸ２タンパク質のウエスタンブロット分析の代表的画像。（Ｃ）細胞内ＮＯＸ２量を、ＧＡＰＤＨ内在性コントロールに対する濃度測定によって定量化した。（Ｄ）分泌ＮＯＸ２タンパク質の定量化をタンパク質収集時の細胞数に対して規格化した。データをクラスター化線形回帰によって解析した。統計的有意性（Ｐ≦０．０５）をアステリスクで示した。

【０３７３】

ウエスタンブロット法を使用して、非悪性前立腺細胞株（ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２）及び前立腺癌細胞株（２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ）由来の細胞溶解物及び培地におけるＮＯＸ２量を規定した。ＮＯＸ２（５６ｋＤａ）の細胞内量は、癌細胞において非悪性細胞に比べて有意に増加した（図４１Ａ、Ｃ）。ＮＯＸ２のアイソフォーム（３０ｋＤａ）が非悪性及び前立腺癌細胞において発現されたが、これは有意に変化しなかった。５６ｋＤａ形態のＮＯＸ２は分泌されなかったが、前立腺癌及び非悪性細胞由来の３０ｋＤａアイソフォームの分泌の証拠が存在した（図４１Ｂ、Ｄ）。ＮＯＸ２抗体－１／２０００希釈（０．５μｇ／ｍＬ）で用いたＡｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ３１０９２のウサギポリクローナル。

【０３７４】

（ｘｖｉｉｉ）前立腺癌組織におけるＮＯＸ２遺伝子発現の変化。
図４２は、ＮＯＸ２の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１）。
【０３７５】
ＮＯＸ２転写物の発現をトムリンス、テイラー及びグラソーコホートから分析した。ＮＯＸ２遺伝子発現は、グラソーコホートの癌組織において非悪性組織よりも有意な増加を示した（Ｐ≦０．０００１）。トムリンスコホートの疾患タイプの分析によって、病期にわたる発現の変化、及び原発性癌組織におけるＮＯＸ２発現の非悪性正常前立腺組織に比べた有意な増加（Ｐ≦０．０１）が明らかになった。
【０３７６】
（ｘｉｘ）前立腺癌細胞におけるＮＯＸ４は非悪性細胞と変わらない。
図４３は、非悪性コントロール及び前立腺癌細胞株由来のＮＯＸ４タンパク質の検出及び定量化を示す。（Ａ）３つ組で検査した非悪性コントロール細胞株ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２並びに癌細胞株２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ由来の全細胞溶解物１０μｇのウエスタンブロット分析の代表的画像。（Ｂ）細胞内ＮＯＸ４タンパク量を、ＧＡＰＤＨ内在性コントロールに対する濃度測定によって定量化した。データをクラスター化線形回帰によって分析した。非悪性細胞株群と癌細胞株群に統計的有意性はなかった。これらの細胞株由来の分泌タンパク質を分析したが（ＮＯＸ２参照）、ＮＯＸ４のシグナルは検出されなかった。
【０３７７】
ウエスタンブロット法を使用して、非悪性前立腺細胞株（ＰＮＴ１ａ及びＰＮＴ２）及び前立腺癌細胞株（２２ＲＶ１、ＤＵ－１４５及びＬＮＣａＰ）由来の細胞溶解物及び培地におけるＮＯＸ４量を規定した。ＮＯＸ４（６３ｋＤａ）の細胞内量は、癌細胞と非悪性細胞で変わらなかった（図４３Ａ、Ｂ）。分泌ＮＯＸ４タンパク質は検出できなかった（データ示さず）。
【０３７８】
（ｘｘ）前立腺癌組織におけるＮＯＸ４遺伝子発現の変化。
図４４は、ＮＯＸ４の遺伝子発現の変化率（テイラーコホート）及びＬｏｇ２中央値を中心とした比（グラソーコホート）を示す箱ひげグラフ、並びにトムリンスらによるコホート由来の遺伝子発現データの垂直散布図である。統計的有意性をアステリスクで示す（＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１、＊＊Ｐ≦０．０１、＊Ｐ≦０．０５）。
【０３７９】
ＮＯＸ４転写物の発現をトムリンス、テイラー及びグラソーコホートから分析した。ＮＯＸ４遺伝子発現は、テイラー及びグラソーコホートの癌組織において非悪性組織よりも有意な増加を示した（それぞれＰ≦０．０１及びＰ≦０．０００１）。トムリンスコホートの疾患タイプの分析によれば、転移性組織におけるＮＯＸ４発現はＰＩＮ組織に比べて有意に増加した（Ｐ≦０．０５）。ＮＯＸ４抗体－１／２０００希釈（０．５μｇ／ｍＬ）で用いたＡｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ１３３３０３のウサギモノクローナル。
【０３８０】
（ｘｘｉ）前立腺組織におけるＡＰＰＬ１、Ｒａｂ７及びＬＩＭＰＩＩ発現の変化（図４９）。
図４５は、前立腺組織におけるＡＰＰＬ１、Ｒａｂ７及びＬＩＭＰＩＩ発現を示す。対応ヒト非悪性（Ａ、Ｂ、Ｃ）及び悪性（Ｄ、Ｅ、Ｆ）前立腺組織におけるＡＰＰＬ１、Ｒａｂ７及びＬＩＭＰＩＩ。Ａの矢印は、非悪性前立腺組織における基底膜を染色するＡＰＰＬ１を示す。悪性前立腺組織においては、（Ｄ）破線の矢印は、核と核小体の両方を染色するＡＰＰＬ１を示し、実線の矢印は、明白な核膜染色を示し、（Ｅ）矢印は明白なＲａｂ７核膜染色を示し、（Ｆ）矢印は、増大したＬＩＭＰＩＩ陽性小胞を示す。スケールバー＝Ａ、Ｂ＆Ｃは１００μＭ、Ｄ、Ｅ、Ｆは２００μＭ。使用抗体：ウサギ抗ＡＰＰＬ

１＃３（検出Ａｂ）、ウサギ抗Ｒａｂ７＃１（検出Ａｂ）、ヒツジ抗ＬＩＭＰＩＩ　Ａｂ。

【０３８１】

免疫組織化学を使用して、前立腺癌組織におけるＡＰＰＬ１、低分子量ＧＴＰアーゼＲａｂ７及びＬＩＭＰＩＩの分布を調べた。エンドソームマーカーＡＰＰＬ１は、非悪性前立腺組織において有意な基底膜染色を示した。悪性組織においては、腫りゅうに付随した染色が増加し、興奮させることには、腫よう細胞における極めて特異的な核及び核小体染色が存在するように見えた。この染色は、非悪性組織では見られなかった。Ｒａｂ７特異的細胞質染色が非悪性組織における間質及び腺構造に認められた。それに対して、明瞭な核膜染色が悪性組織に認められ、細胞質染色量は正常組織に比べて減少したように見えた。ＬＩＭＰＩＩ染色は、悪性組織と非悪性組織の両方で類似しているように見えたが、コントロール組織に比べてＬＩＭＰＩＩ陽性小胞構造の増大が悪性組織に認められた。

【０３８２】

実施例８－前立腺癌の診断、及びマーカー（単数又は複数）の診断／予知可能性に基づいた治療選択肢

前立腺癌の存在の診断は、本明細書に記載のマーカーのいずれかについての１つ以上のｍＲＮＡの１つ以上のｍＲＮＡ発現レベル、本明細書に記載のマーカータンパク質のレベル、本明細書に記載のマーカータンパク質の分泌、本明細書に記載の体液中のマーカータンパク質の存在に基づいて、又は本明細書に記載のマーカータンパク質のいずれかの組織若しくは生検試料上の免疫組織学に基づいて、成すことができる。

【０３８３】

使用することができる選択されたマーカーの例としては、以下のタンパク質又はそのｍＲＮＡの１種以上が挙げられる：カテプシンＢ、カテプシンＤ、α－ガラクトシダーゼ、ＲＡＢ７、ＬＩＭＰ－１、ＬＩＭＰ－２、ＴＦＲ１、ＴＦＲ２、ＳＴＡＭＰ２、ＳＯＲＴ１（ソルチリン）、ＡＰＰＬ１、ＥＥＡ－１、ＬＡＭＰ－１、ＲＡＢ４、ＡＰＰＬ２、ＲＡＢ５、ＲＡＢ１１、ＭＰＲ、ＰＡＰ、アクチン、Ｍ６ＰＲ、ＩＧＦＲ２、ＭＹＯ１Ｂ、ＰＤＣＤ６ＩＰ、ＳＤＣＢＰ、ＳＤＣ１、ＳＴＸ７、ＳＴＸ１２、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＮＯＸ２及びＮＯＸ４。

【０３８４】

例えば、前立腺組織の円柱状試料（生検試料）を中空針を用いて直腸を通して取り出すことができ、試料の一部を組織学及び免疫組織化学用に調製することができる。前立腺を外科的に除去する場合、病理医は、分析用に前立腺の切片を調製することができる。

【０３８５】

ＡＰＰＬ１を適切なマーカーとして選択することができ、分析を免疫組織化学を利用して実施例１に記載のように実施して、ＡＰＰＬ１特異抗体を用いてＡＰＰＬ１の分布を測定することができる。ＡＰＰＬ１は、癌周縁部を描出し、腫りゅう内の染色を劇的に増加させる。かかる染色は、前立腺癌の存在を示していると考えられる。

【０３８６】

本明細書に記載の選択されたマーカーを用いた検出に基づいて、本明細書に記載の選択されたマーカーの予後値に加えて、又はそれと併せて、癌の診断及び／又は予知及び再発度に依存して、種々の治療選択肢が利用可能である。

【０３８７】

（ｉ）低再発リスク：

臨床病期Ｔ１～Ｔ２ａ、グリーソンスコア２～６、ＰＳＡ＜１０ｎｇ／ｍＬ、平均余命＜１０年の患者の治療は、監視療法を含む。

【０３８８】

平均余命≧１０年の患者の治療は、監視療法、又はリンパ節転移の予測確率≧２％である場合、骨盤リンパ節郭清（ＰＬＮＤ：ｐｅｌｖｉｃ　ｌｙｍｐｈ　ｎｏｄｅ　ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ）を伴う若しくは伴わない前立腺全摘出術（ＲＰ：ｒａｄｉｃａｌ　ｐｒｏｓｔａｔｅｃｔｏｍｙ）を含む。ＲＰは、限局性前立腺癌の標準療法であり、骨盤リンパ

節を含む又は含まない前立腺及び精嚢の除去を含む。これは、開放術又は腹腔鏡（ロボット支援）技術を用いて行うことができる。

【０３８９】

限局性疾患患者の放射線療法、毒性の低減、より高線量の使用などの利点をもたらす、３Ｄ原体照射治療（３Ｄ－ＣＲＴ）などの３次元（３Ｄ：３－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ）技術、及び強度変調放射線治療（ＩＭＲＴ：ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ－ｍｏｄｕｌａｔｅｄ ｒａｄｉａｔｉｏｎ ｔｈｅｒａｐｙ）を含めた第二世代技術も必要になり得る。特に、線量≧７８Ｇｙを投与する場合にそうである。

【０３９０】

３Ｄ－ＣＲＴ／ＩＭＲＴと毎日の画像誘導放射線治療（ＩＧＲＴ：ｉｍａｇｅ－ｇｕｉｄｅｄ ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ）又は密封小線源治療（推奨線量率：ヨウ素１２５の場合１４５Ｇｙ、及びパラジウム１０３の場合１２５Ｇｙ）による前立腺への従来の３６～４１分割の放射線治療線量７５．６～７９Ｇｙ。

【０３９１】

低リスク癌患者は、一般に、骨盤リンパ節照射又はアンドロゲン遮断療法（ＡＤＴ：ａｎｄｒｏｇｅｎ ｄｅｐｒｉｖａｔｉｏｎ ｔｈｅｒａｐｙ）の候補ではない。

【０３９２】

（ｉｉ）中間再発リスク：

臨床病期Ｔ２ｂ～Ｔ２ｃ、グリーソンスコア７、ＰＳＡ１０～２０ｎｇ／ｍＬ、平均余命＜１０年の患者の治療は、監視療法を含む。

【０３９３】

３Ｄ－ＣＲＴ／ＩＭＲＴと密封小線源治療（推奨線量率：ヨウ素１２５の場合１４５Ｇｙ、及びパラジウム１０３の場合１２５Ｇｙ）を伴う若しくは伴わない４～６か月の短期ネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴを伴う若しくは伴わない毎日のＩＧＲＴによる放射線療法（線量７８～８０＋Ｇｙ）。

【０３９４】

平均余命≧１０年の患者の推奨治療としては、リンパ節転移の予測確率≧２％である場合のＰＬＮＤを伴うＲＰ、又は３Ｄ－ＣＲＴ／ＩＭＲＴと密封小線源治療（推奨線量率：ヨウ素１２５の場合１４５Ｇｙ、及びパラジウム１０３の場合１２５Ｇｙ）を伴う若しくは伴わない４～６か月の短期ネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴを伴う若しくは伴わない毎日のＩＧＲＴによる放射線療法（線量７８～８０＋Ｇｙ）が挙げられる。

【０３９５】

中間リスク癌は、密封小線源治療（推奨線量率：ヨウ素１２５の場合１４５Ｇｙ、及びパラジウム１０３の場合１２５Ｇｙ）と４～６か月のネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴを伴う若しくは伴わないＥＢＲＴ（４０～５０Ｇｙ）の組合せを考える。

【０３９６】

照射前、照射中及び照射後にＡＤＴを施すと患者を延命する。

【０３９７】

（ｉｉｉ）高再発リスク：

臨床ステージＴ３ａ、グリーソンスコア８～１０、ＰＳＡ＞２０ｎｇ／ｍＬ

治療選択肢としては、放射線療法（線量７８～８０＋Ｇｙ）と３Ｄ－ＣＲＴ／ＩＭＲＴプラス２～３年の長期ネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴ、又は放射線療法（線量７８～８０＋Ｇｙ）と３Ｄ－ＣＲＴ／ＩＭＲＴと毎日のＩＧＲＴプラス４～６か月の短期ネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴを伴う若しくは伴わない密封小線源治療（推奨線量率：ヨウ素１２５の場合１４５Ｇｙ、及びパラジウム１０３の場合１２５Ｇｙ）、又は修復のない選択患者の場合のＲＰプラスＰＬＮＤが挙げられる。

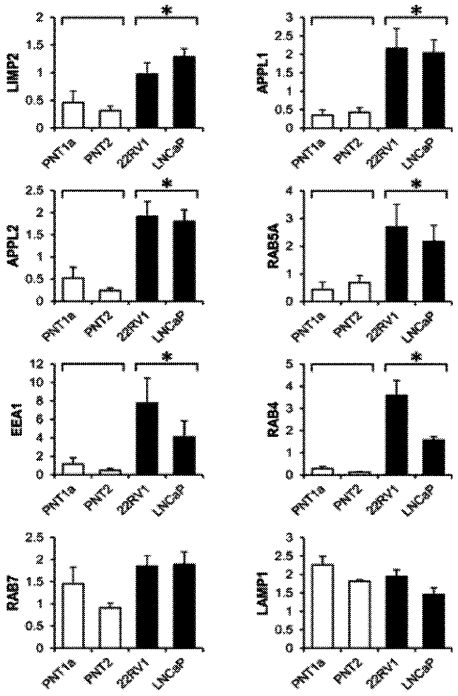
【０３９８】

ハイリスク癌は、ＥＢＲＴ（４０～５０Ｇｙ）と４～６か月のネオアジュバント／同時／アジュバントＡＤＴを伴う若しくは伴わない密封小線源治療の組合せで治療することができる。

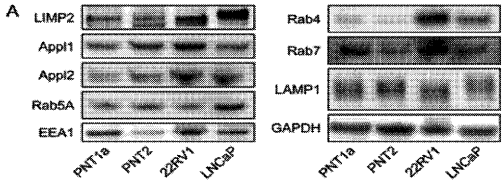
【０３９９】
本明細書における先行技術の参照は、この先行技術がどの国においても一般的常識の一部を成すことを認めるものでも何ら示唆するものでもなく、そのように解釈すべきでもない。
【０４００】
本明細書を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「（複数を）含む」という語、又は「（単数を）含む」、「含むこと」などの変形は、示した要素若しくは整数又は要素若しくは整数の群を含むが、他の要素若しくは整数も要素若しくは整数の群も排除しないことを意味すると理解されたい。
【０４０１】
本明細書では、単数形「１つの（ａ、ａｎ）」及び「前記（ｔｈｅ）」は、文脈が別のことを明示しない限り、複数の態様を含む。
【０４０２】
本明細書に記載したすべての方法は、本明細書で別段の記載がない限り、又は状況が明白に矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書に記載した任意及びすべての実施例又は例示的文言（例えば、「など」）の使用は、単に実施形態をより明確にすることを意図したものにすぎず、別段の記載がない限り、請求項に係る発明の範囲を限定するものではない。本明細書中の文言は、請求項に記載されていない要素を必須のものとして示していると解釈すべきではない。
【０４０３】
本明細書の記述は、共通の特性及び特徴を共有し得る幾つかの実施形態に関連する。１つの実施形態の１つ以上の特徴を他の実施形態の１つ以上の特徴と組み合わせられることを理解されたい。さらに、実施形態の単一の特徴又は特徴の組合せも、追加の実施形態を構成することができる。
【０４０４】
本明細書で使用する見出しは、読者の参照を容易にするためのものにすぎず、本開示又は請求項に記載の主題を限定するために使用されるべきではない。見出しは、請求項の範囲、又は請求項を限定するものと解釈するのに使用されるべきではない。
【０４０５】
本願に基づいて、例えば、本願から優先権を主張することによって、分割状態を主張することによって、及び／又は継続状態を主張することによって、今後、特許を出願することができる。以下の請求項は単なる例にすぎず、かかる将来の出願において請求され得る事柄の範囲を限定することを意図したものではないことを理解されたい。請求項が、本開示の理解を限定する（又は別の理解を排除する）と考えるべきでもない。後日、例示の請求項に特徴を追加することができ、又は例示の請求項から特徴を削除することができる。
【０４０６】
本開示を特定の実施例を参照して記述したが、本開示を多数の他の形態で実施し得ることを当業者は理解されたい。

【図１】

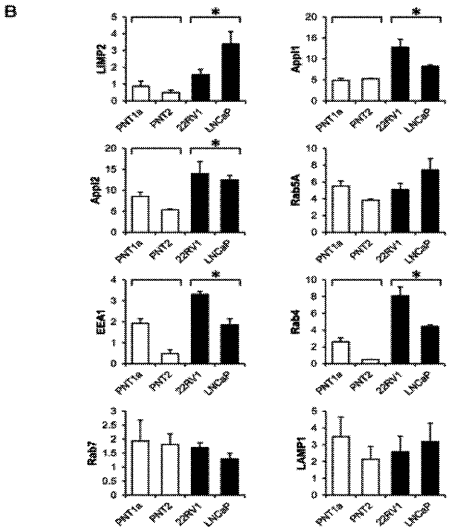
Figure 1



【図２Ａ】

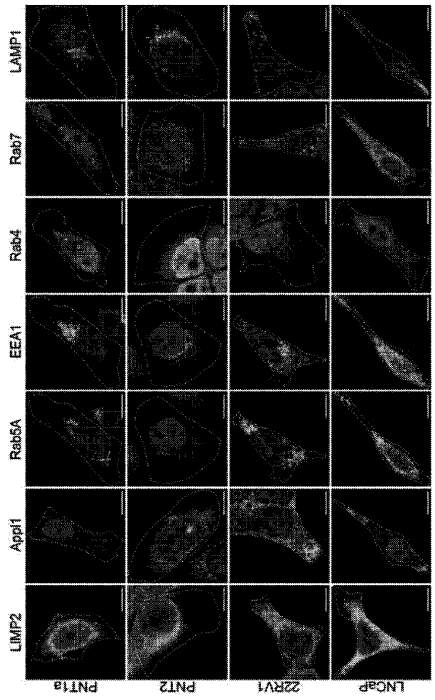


【図２Ｂ】



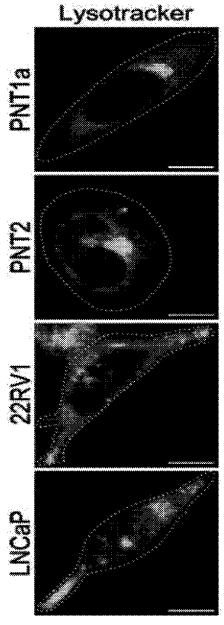
【図３】

Figure 3



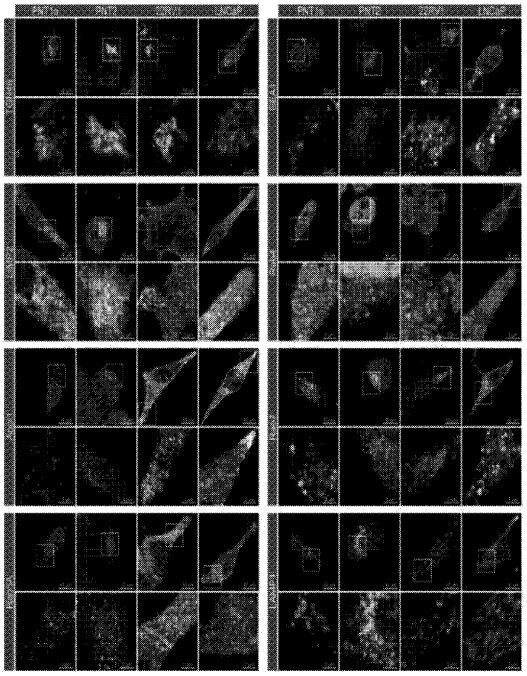
【図４】

Figure 4

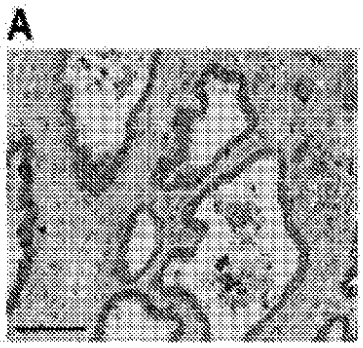


【図６】

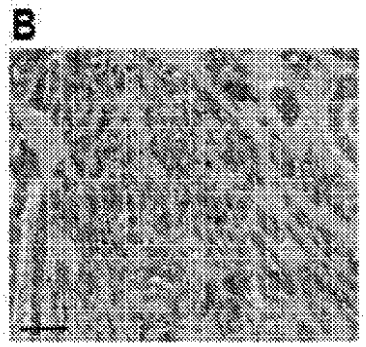
Figure 6



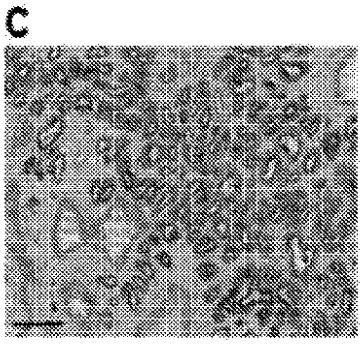
【図９Ａ】



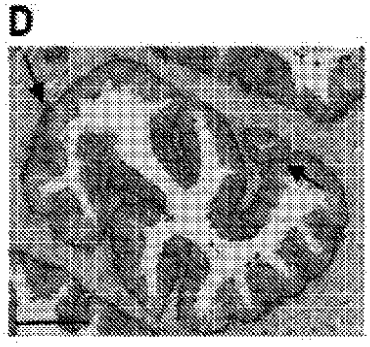
【図９Ｂ】



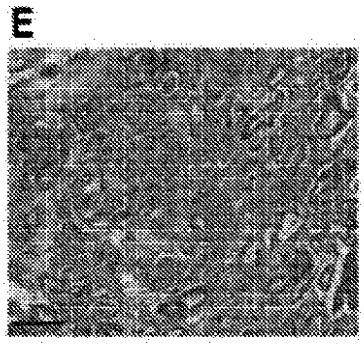
【図９Ｃ】



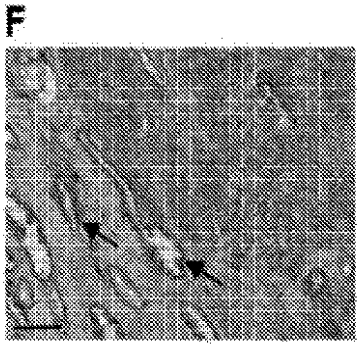
【図９Ｄ】



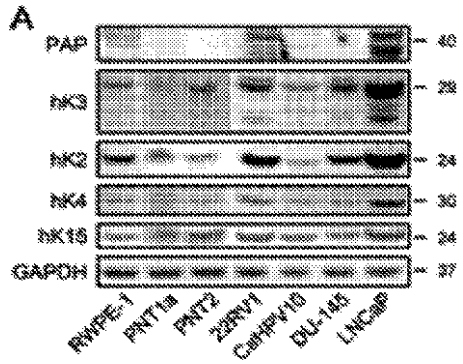
【図９Ｅ】



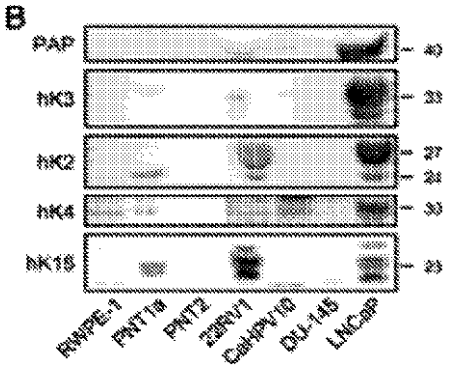
【図９Ｆ】



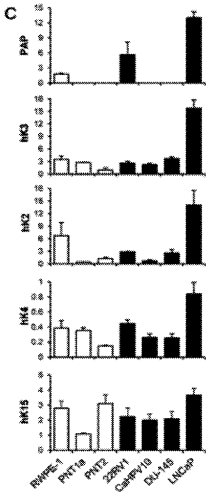
【図１０Ａ】



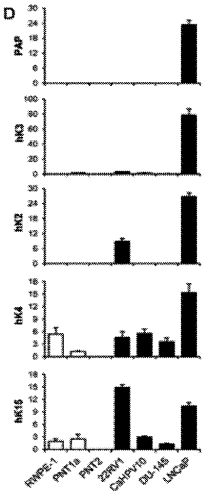
【図１０Ｂ】



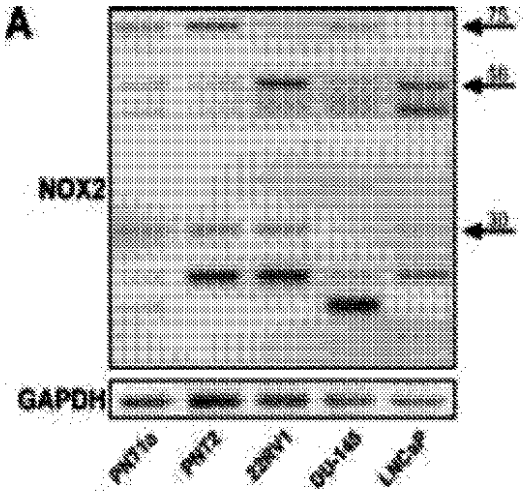
【図１０Ｃ】



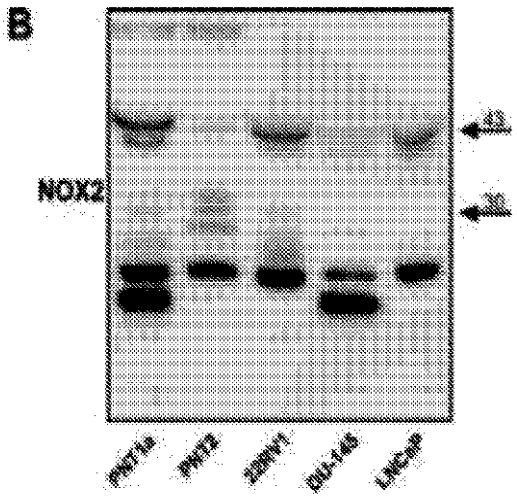
【図１０Ｄ】



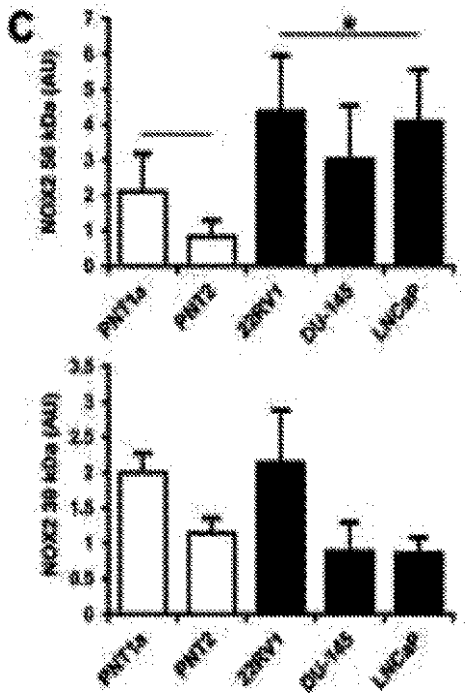
【図４１Ａ】



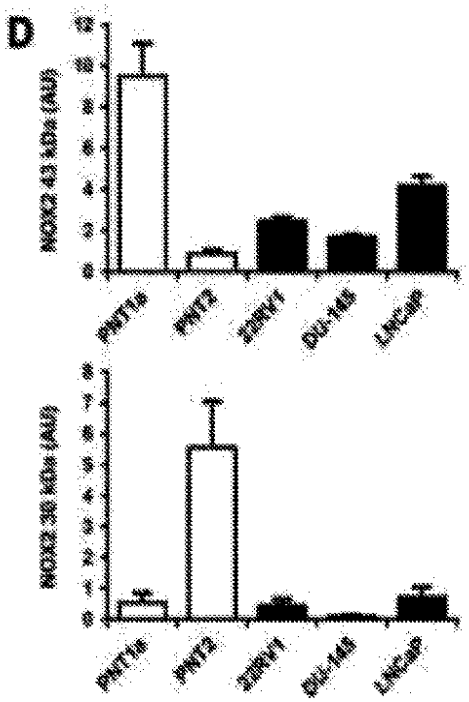
【図４１Ｂ】



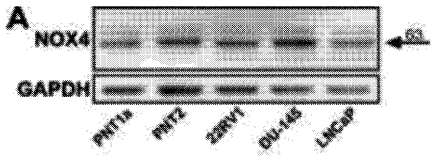
【図４１Ｃ】



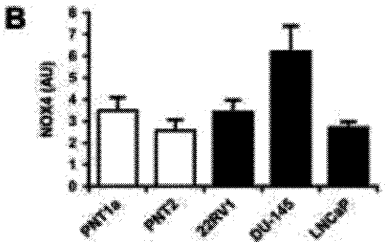
【図４１Ｄ】



【図４３Ａ】

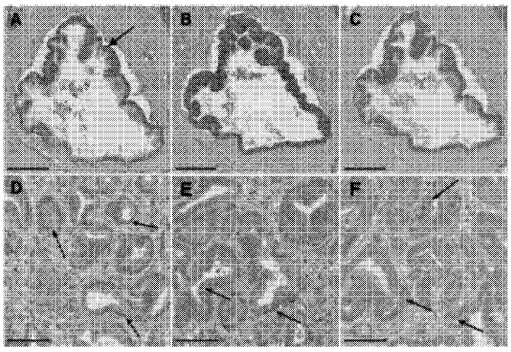


【図４３Ｂ】

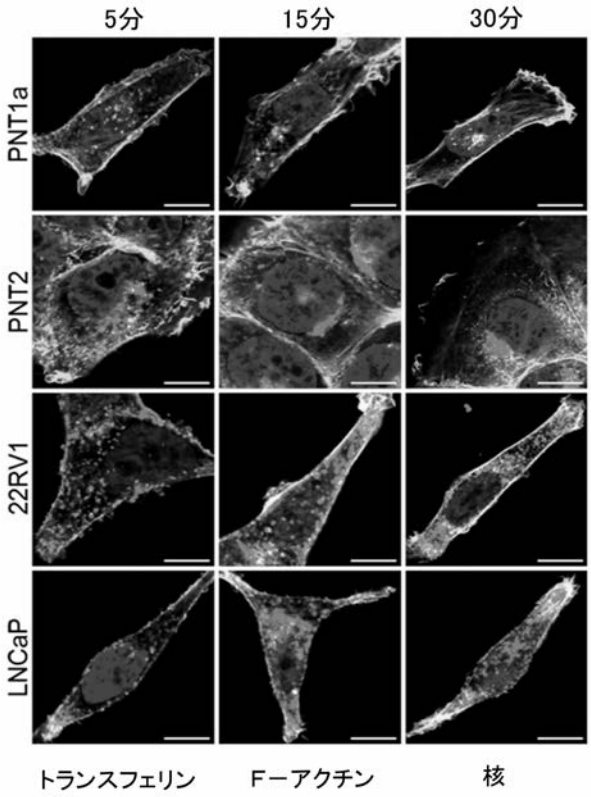


【図４５】

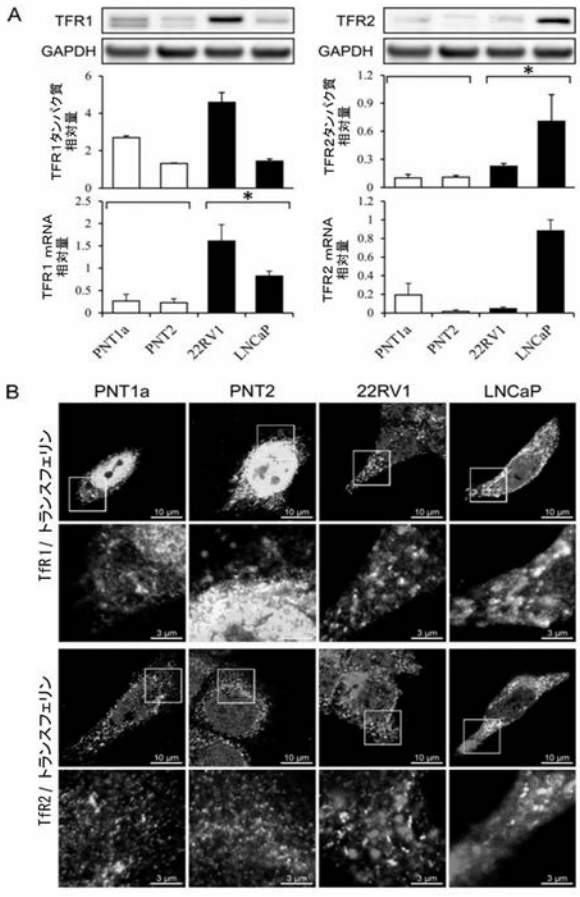
Figure 45



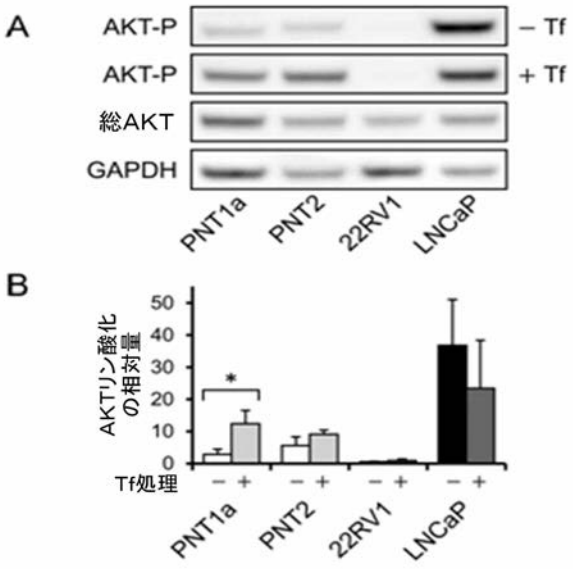
【図５】



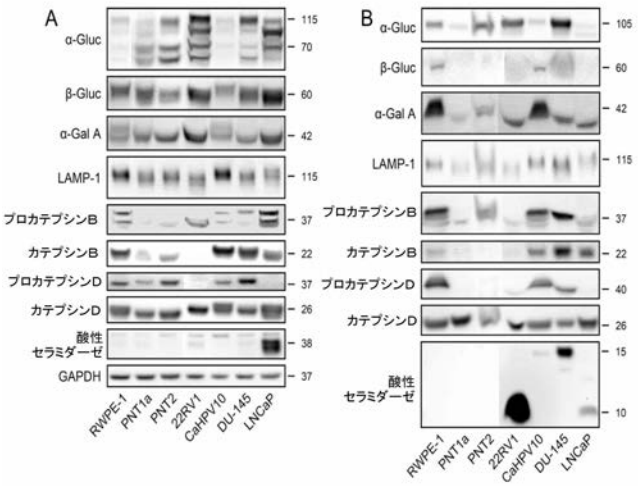
【図７】



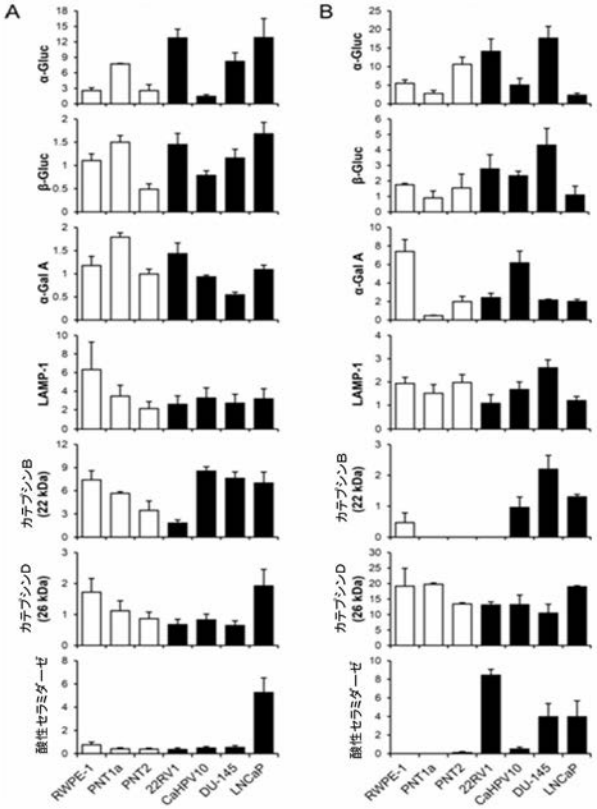
【図８】



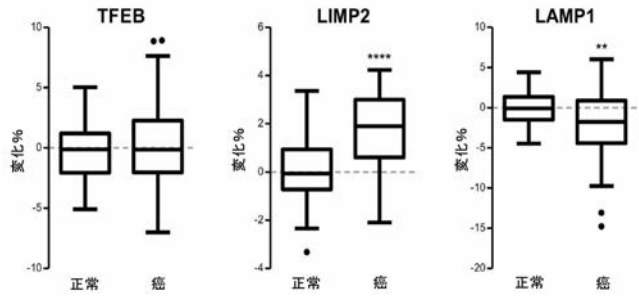
【図１１】



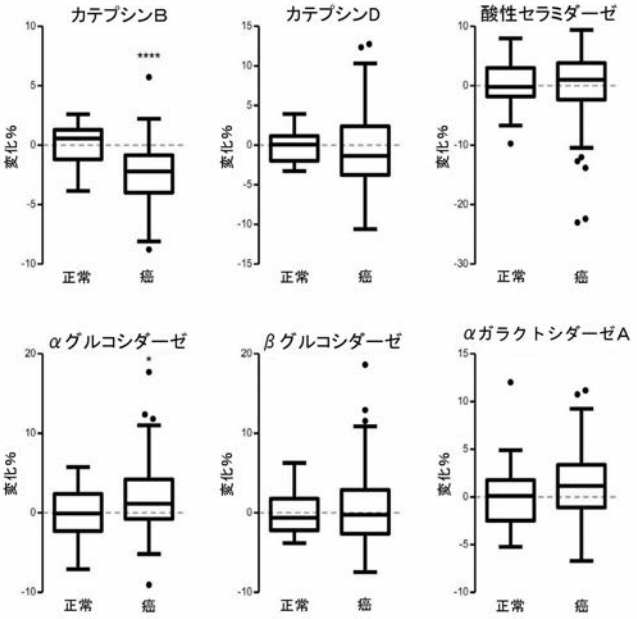
【図１２】



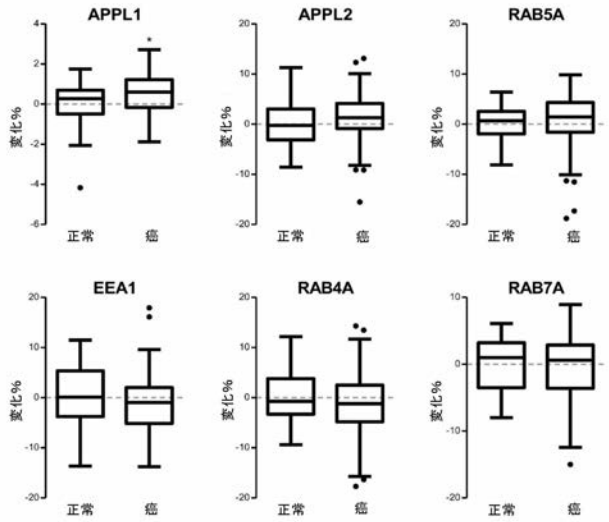
【図１３】



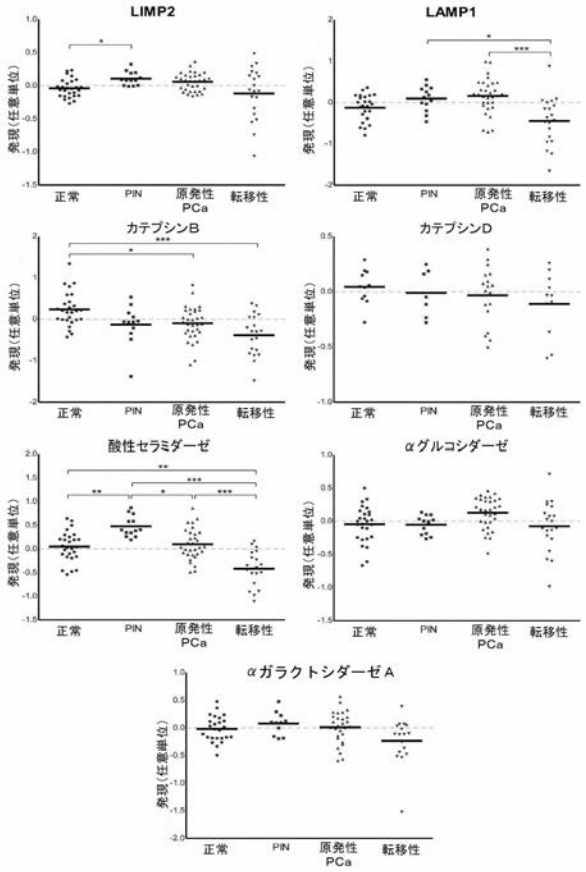
【図１４】



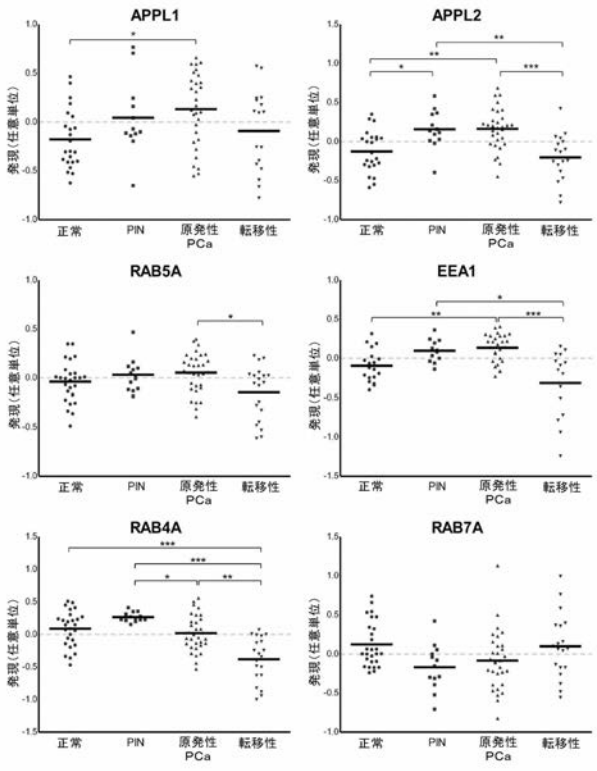
【図１５】



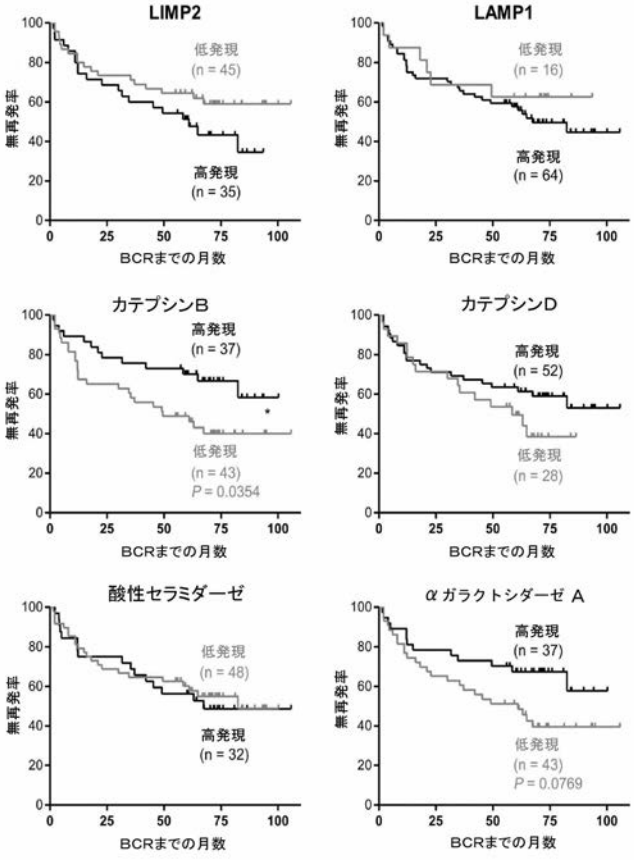
【図１６】



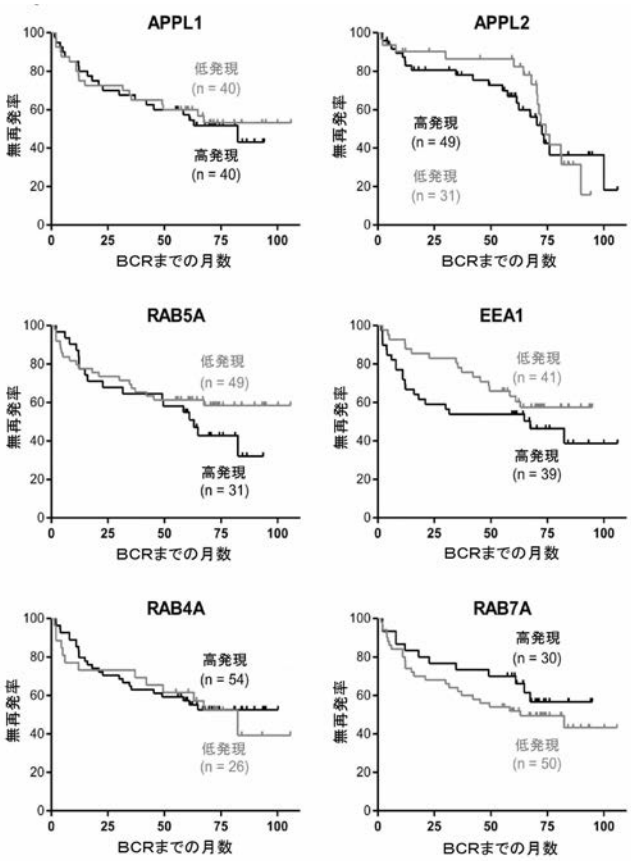
【図１７】



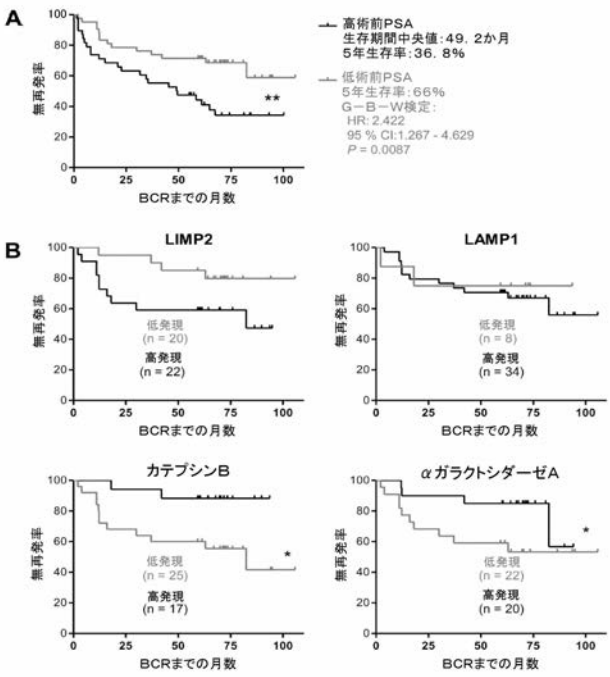
【図１８】



【図１９】



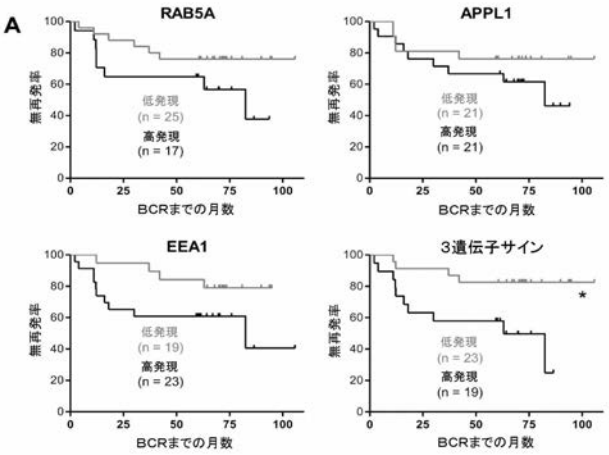
【図２０】



C

遺伝子	P	HR	95 % CI
LIMP2	0.0544	2.651	0.9128 - 7.699
LAMP1	0.8120	1.323	0.3410 - 5.137
カテプシンB	0.0190	0.2752	0.09555 - 0.7924
αガラクトシダーゼA	0.0396	0.3859	0.1342 - 1.110

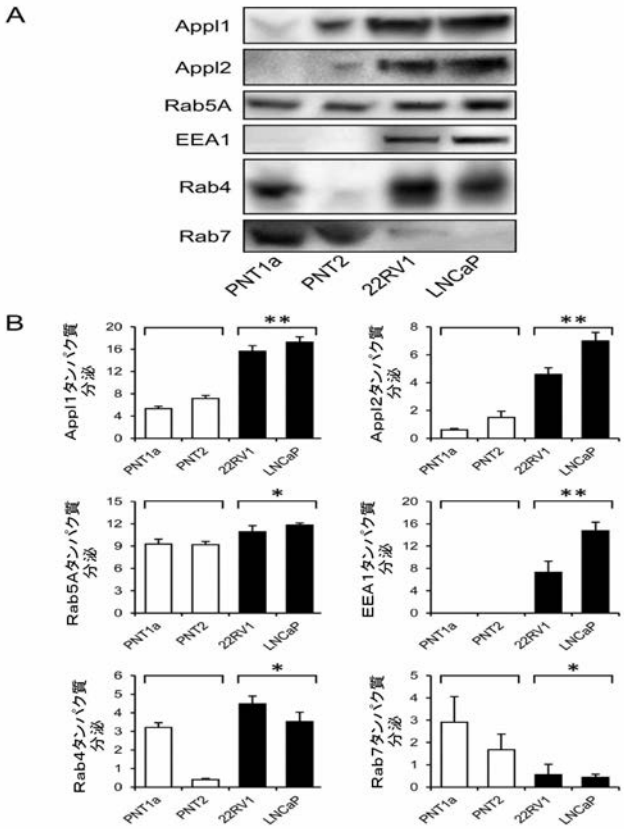
【図２１】



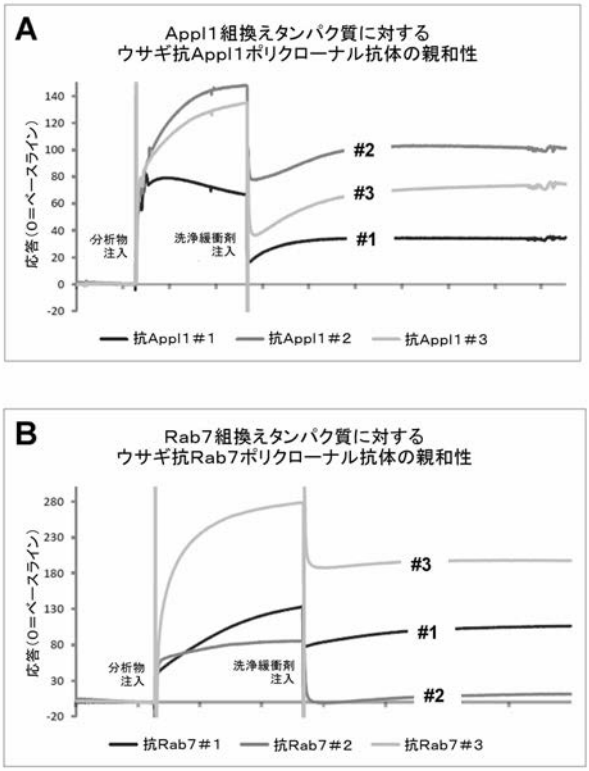
B

遺伝子	P	HR	95 % CI
RAB5A	0.1693	2.387	0.8015 - 7.107
APPL1	0.4131	1.794	0.6258 - 5.145
EEA1	0.0700	2.618	0.9090 - 7.538
3-遺伝子	0.0221	4.138	1.3950 - 2.270

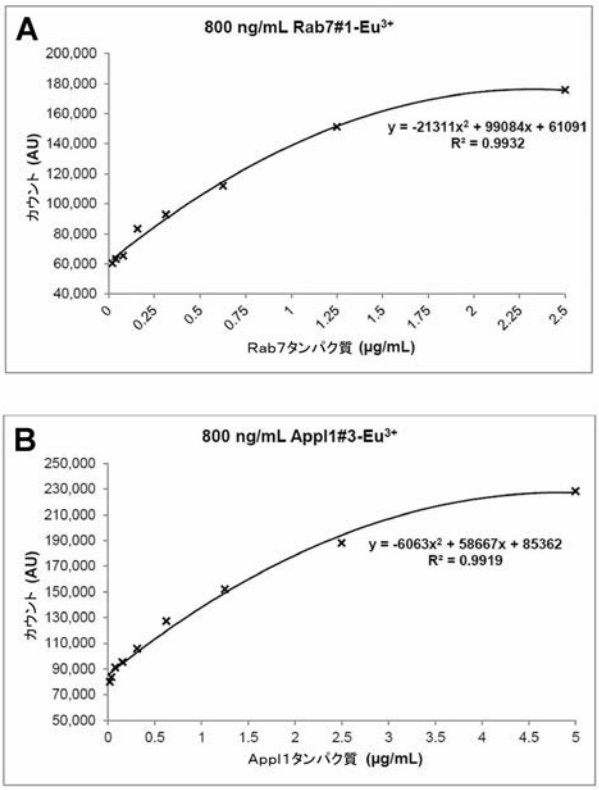
【図２２】



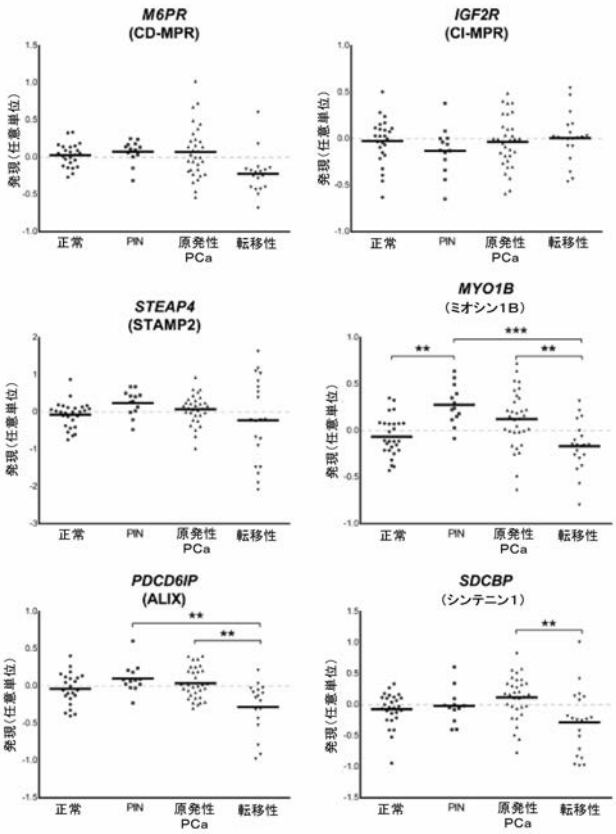
【図２３】



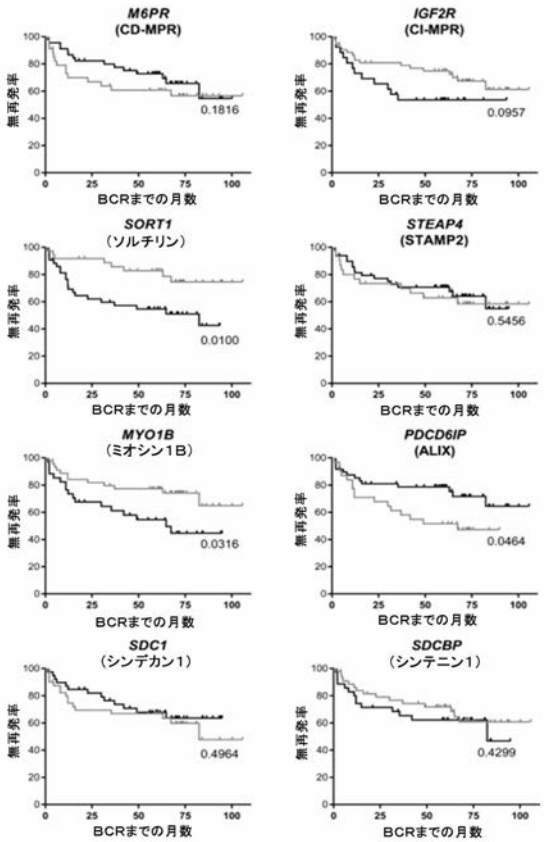
【図２４】



【図２５】



【図２６－１】

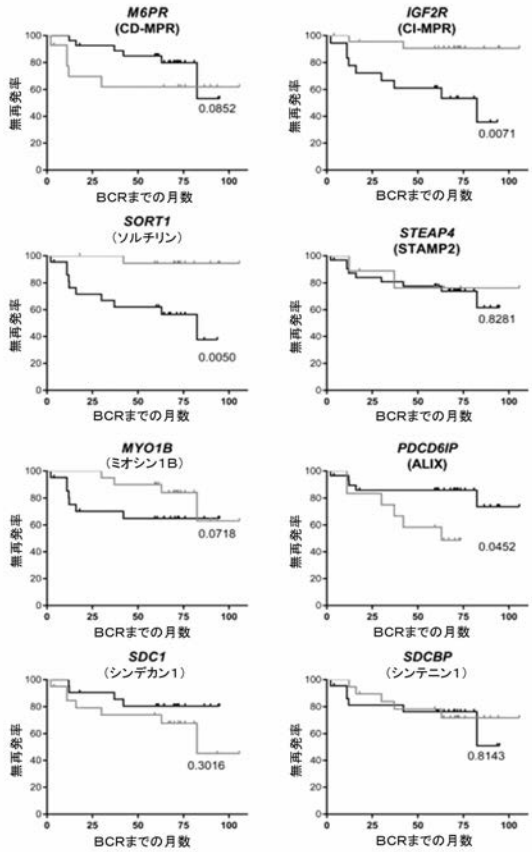


【図２６－２】

図26(続き)

遺伝子	P	HR	95 % CI
M6PR	0.182	0.716	0.337 – 1.486
IGF2R	0.073	1.938	0.938 – 4.041
SORT1	0.010	2.732	1.246 – 5.343
STEAP4	0.546	0.861	0.405 – 1.817
MYO1B	0.032	2.230	1.100 – 4.898
PDCD61P	0.047	0.476	0.213 – 0.960
SDC1	0.496	0.777	0.374 – 1.606
SDCBP	0.430	1.262	0.607 – 2.649

【図２７－１】

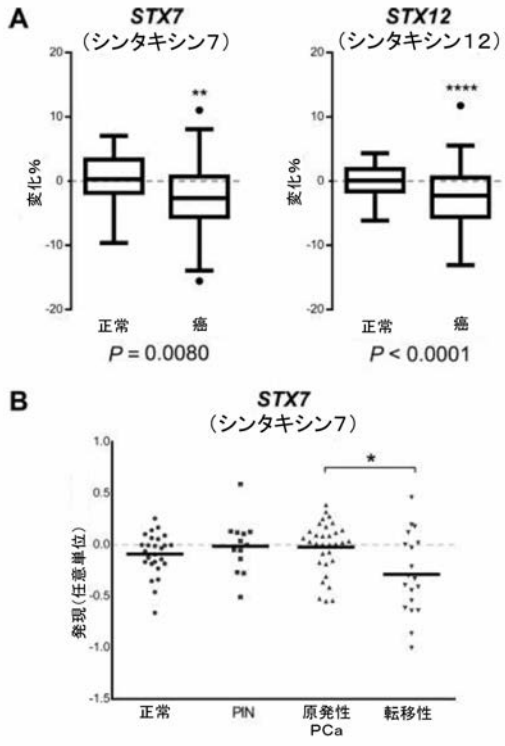


【図２７－２】

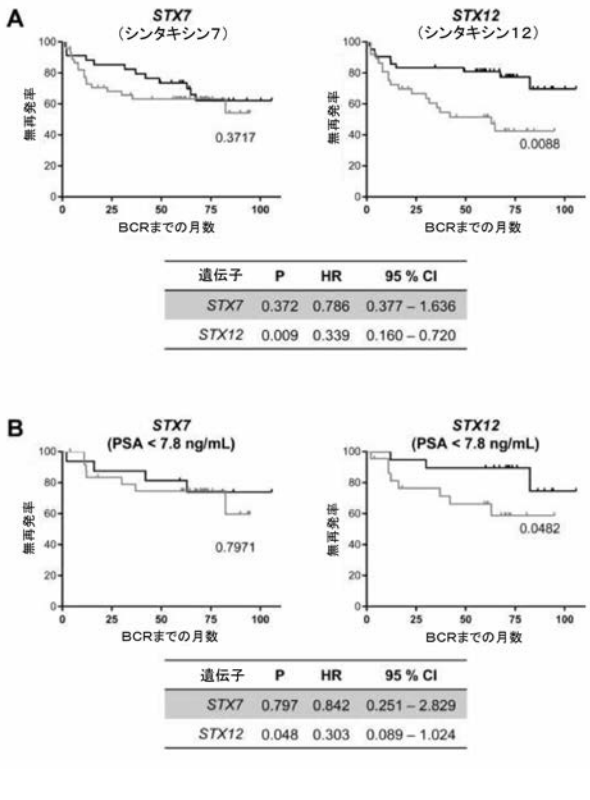
図27(続き)

遺伝子	P	HR	95 % CI
M6PR	0.085	0.538	0.137 – 1.771
IGF2R	0.007	6.808	1.759 – 19.68
SORT1	0.005	11.33	1.825 – 19.49
STEAP4	0.828	1.209	0.282 – 5.094
MYO1B	0.072	2.205	0.673 – 7.273
PDCD61P	0.045	0.288	0.053 – 0.797
SDC1	0.302	0.476	0.146 – 1.565
SDCBP	0.814	1.178	0.362 – 3.846

【図２８】



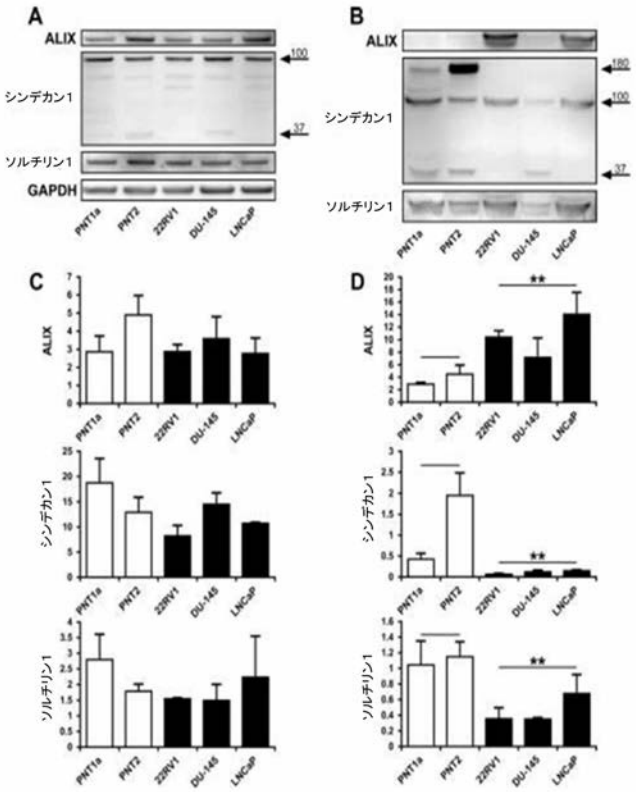
【図２９】



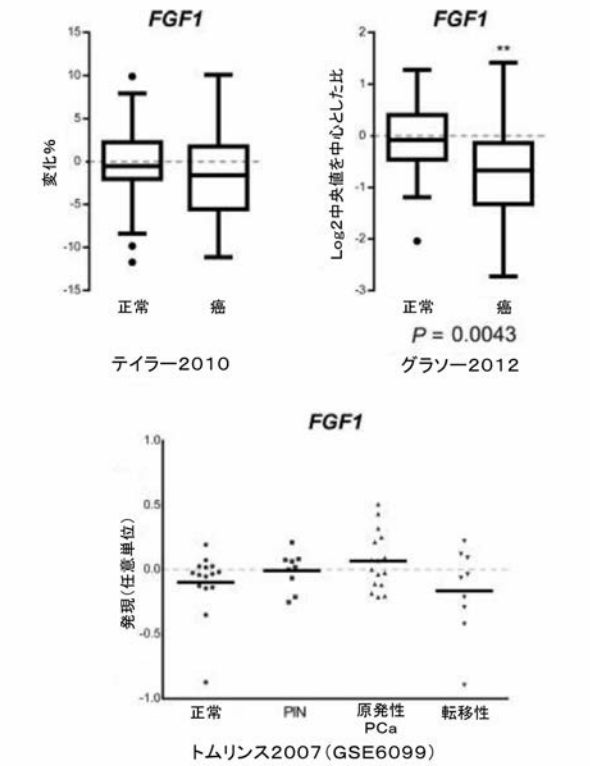
遺伝子	P	HR	95 % CI
STX7	0.372	0.786	0.377 – 1.636
STX12	0.009	0.339	0.160 – 0.720

遺伝子	P	HR	95 % CI
STX7	0.797	0.842	0.251 – 2.829
STX12	0.048	0.303	0.089 – 1.024

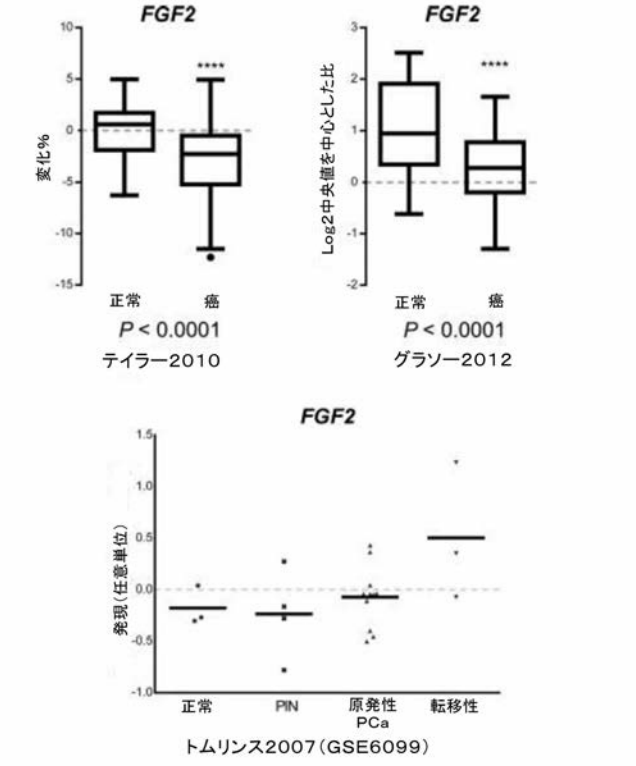
【図３０】



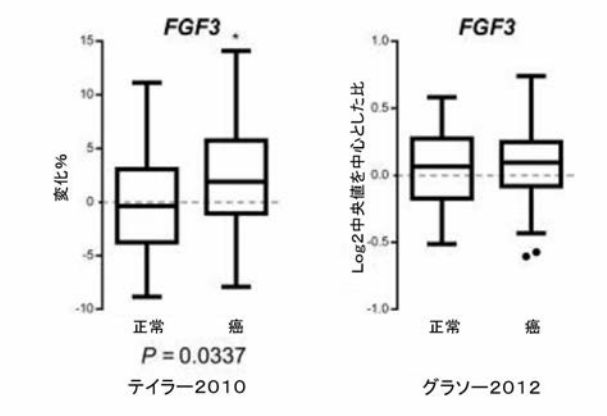
【図３１】



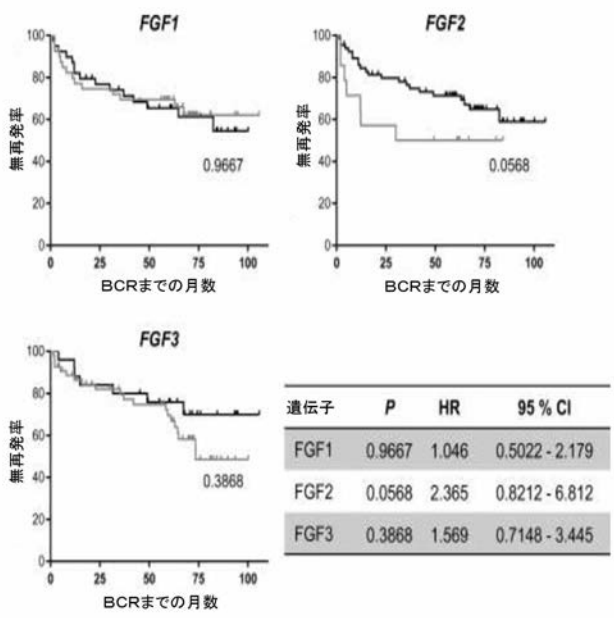
【図３２】



【図３３】

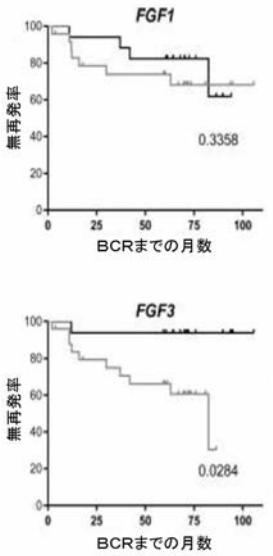


【図３４】



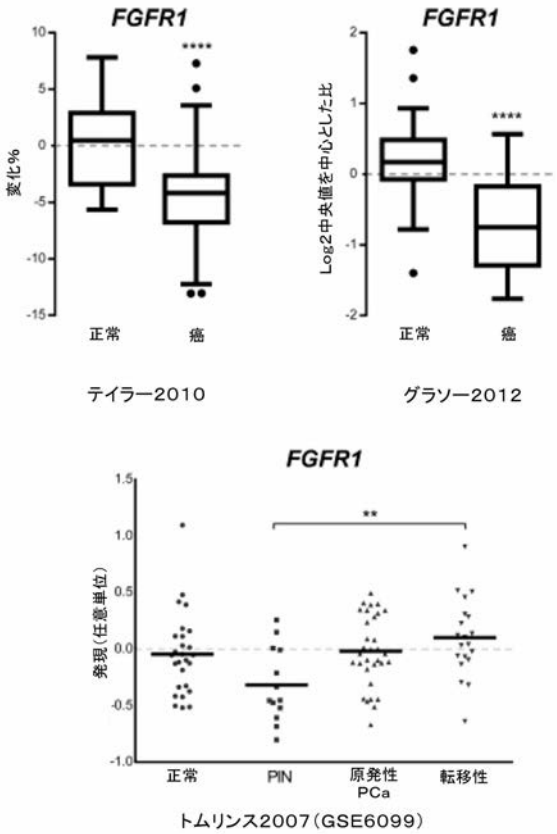
遺伝子	P	HR	95 % CI
FGF1	0.9667	1.046	0.5022 - 2.179
FGF2	0.0568	2.365	0.8212 - 6.812
FGF3	0.3868	1.569	0.7148 - 3.445

【図３５】

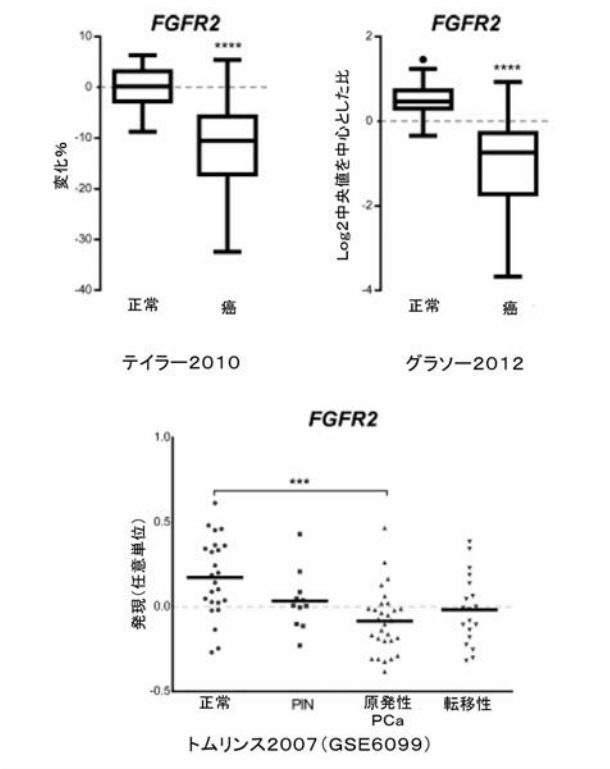


遺伝子	P	HR	95 % CI
FGF1	0.3358	1.524	0.4630 - 5.018
FGF2	0.0116	4.462	1.243 - 16.02
FGF3	0.0284	4.771	1.429 - 15.93

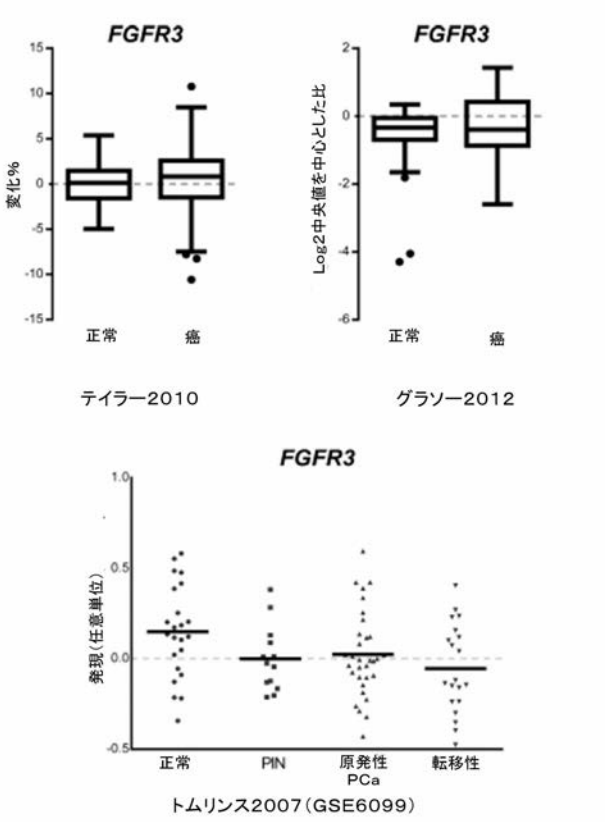
【図３６】



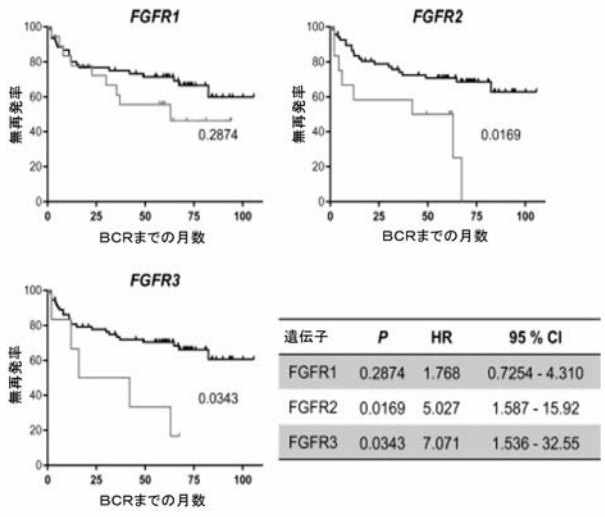
【図３７】



【図３８】

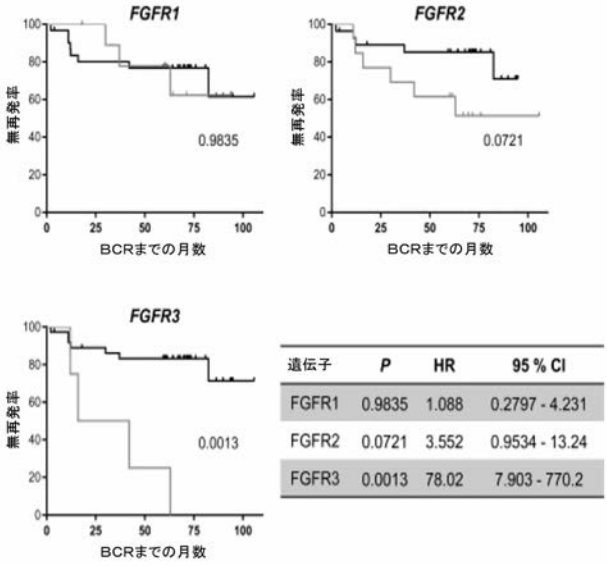


【図３９】



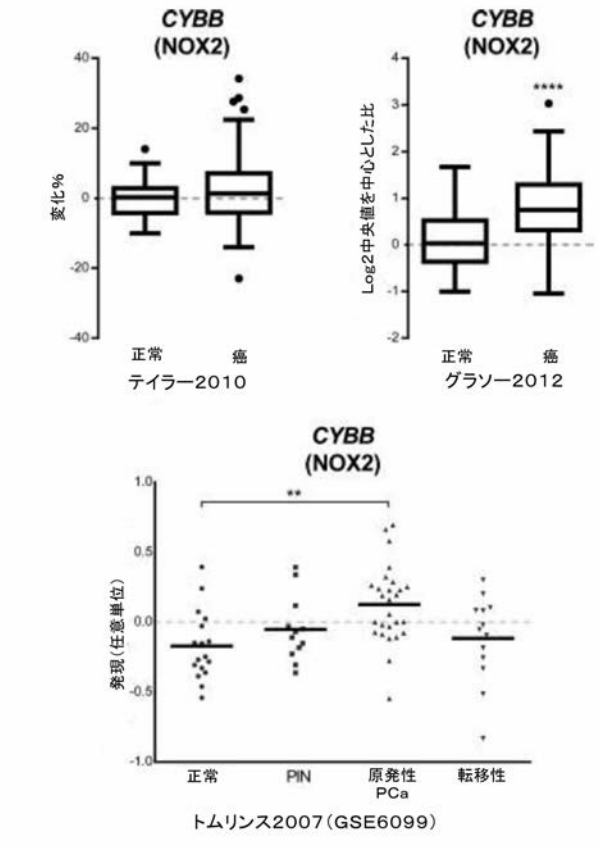
遺伝子	P	HR	95 % CI
FGFR1	0.2874	1.768	0.7254 - 4.310
FGFR2	0.0169	5.027	1.587 - 15.92
FGFR3	0.0343	7.071	1.536 - 32.55

【図４０】

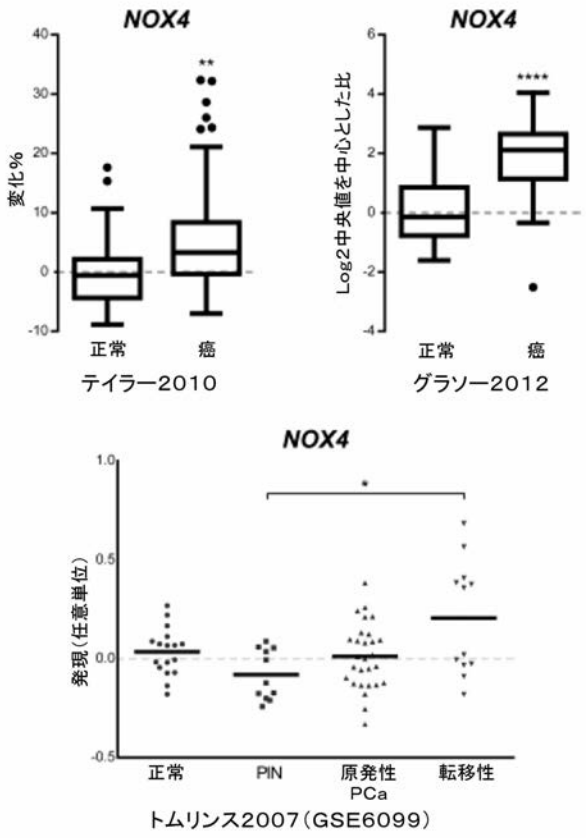


遺伝子	P	HR	95 % CI
FGFR1	0.9835	1.088	0.2797 - 4.231
FGFR2	0.0721	3.552	0.9534 - 13.24
FGFR3	0.0013	78.02	7.903 - 770.2

【図４２】



【図４４】



【配列表】

2016527483000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2014/000612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPOQUE: EPODOC, WPI (Keywords including prostate, cancer, endosome, lysosome, traffick, diagnose/prognose, cathepsin, Rab, alpha galactosidase, LIMP, CD63, CD36, transferrin, TFR1, TFR2, sortilin, stamp2, steap2, APPL1, APPL2, DIP13a, DIP13b, EEA1, LAMP, CD107a, MPR, mannose phosphate, PAP, ACTIN, M6PR, IGFR2, MYO1B, myosin, PDCD6, ALIX, SDCBP, syndecan, SDC1, CD138, STX7, STX12, syntaxin, FGF, FGFR, NOX2, NOX4, CYBB, RENOX, KOX, ACID CERAMIDASE and like terms)

STN: BIOSIS, HCAPLUS, MEDLINE (keywords as for EPOQUE)

GOOGLE: Author names - BROOKS D, PARKINSON-LAWRENCE E, JOHNSON I, BUTLER L, WEIGERT R (and then keywords as for EPOQUE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [ ] See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 September 2014	19 September 2014
Name and mailing address of the ISA/AU	**Authorised officer**
AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Rebecca Hinton AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 62832194

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2014/000612
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Johnson I *et al.* Altered endosome biogenesis in prostate cancer (Colloquia Abstract); ComBio2012; 23-27 September 2012; Adelaide, South Australia; COL-03-01 p92.	
X	Whole Abstract	1-6, 8-50, 53, 54, 56-58
Y	Whole Abstract	1-52, 55, 58
	Mitchell PJ *et al.* Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? J Transl Med. 2009 Jan 12;7:4.	
X	'Electrophoresis and Immuno-blotting' p2-3; p5 and second column p8	1-4, 6, 8, 9, 11, 12, 16-31, 34-37, 40, 43-46, 49, 50, 58
	Kallunki T *et al.* Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? Oncogene. 2013 Apr 18;32(16):1995-2004. Epub 2012 Jul 9. Review.	
Y	Bottom of second column p1995; first paragraph p1996; top of second column p1996; second column p1997; 'Acid Ceramidase' p2000	1-50, 58
	Cherry JP *et al.* Analysis of cathepsin D forms and their clinical implications in human prostate cancer. J Urol. 1998 Dec;160(6 Pt 1):2223-8.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Mosesson Y *et al.* Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. Nat Rev Cancer. 2008 Nov;8(11):835-50.	
Y	First column p836; first column p839, also p845; Box 1 p840; second column p843; top second column p847; Figure 4	1-50,, 51, 52, 55, 58
	Swift SL *et al.* Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. Cancer Res. 2010 Jan 1;70(1):347-56.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Korkmaz CG *et al.* Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. Oncogene. 2005 Jul 21;24(31):4934-45.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Turner N and Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nat Rev Cancer. 2010 Feb;10(2):116-29.	
Y	second column p118; second column p120	1-50, 58
	Qian XL *et al.* Identification and expression of two new secretory proteins associated with prostate cancer. Yi Chuan. 2010 Mar;32(3):235-41. Chinese.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Llorente A *et al.* Cholesterol regulates prostasome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. Eur J Cell Biol. 2007 Jul;86(7):405-15.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Kiviniemi J *et al.* Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. APMIS. 2004 Feb;112(2):89-97.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Kumar B *et al.* Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. Cancer Res. 2008 Mar 15;68(6):1777-85.	
Y	Abstract	1-50, 58
	Camacho L *et al.* Acid ceramidase as a therapeutic target in metastatic prostate cancer. J Lipid Res. 2013 May;54(5):1207-20. Epub 2013 Feb 19.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2014/000612
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Abstract	7

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2014/000612

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   [X] on paper

   [ ] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purposes of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2014/000612

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2014/000612

Supplemental Box

Continuation of: **Box III**

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

- Claims 1-58 are directed to methods for diagnosing, prognosing, classing and treating prostate cancer based on expression of 37 different markers which are 'endosome-associated' or 'lysosome-associated'. This set of claims also comprises claims which are directed toward kits and tools used in these processes.. The feature of a group of biomarkers linked by their association with the endosomal pathway or lysosomal pathway for the diagnosis/prognosis/classing/treatment of prostate cancer is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the association of the biomarkers with the endosomal and lysosomal pathways

However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in:
D1: Johnson *et al.* Altered endosome biogenesis in prostate cancer. COLLOQUIA ABSTRACT: COL-03-01 p92; ComBio Conference 23-27 September 2012; Adelaide, SA.

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

As a consequence of this the biomarkers have been split into the following 21 inventions:

Invention 1: relating to biomarkers Cathepsin B and Cathpsin D

Invention 2: relating to the biomarker α-Galactosidase

Invention 3: relating to the biomarkers Rab4, Rab5, Rab7 and Rab11

Invention 4: relating to the biomarkers Limp-1 and Limp-2

Invention 5: relating to the biomarkers Tfr1 and Tfr2

Invention 6: relating to the biomarker Stamp1

Invention 7: relating to the biomarker Sort1

Invention 8: relating to the biomarkers Appl1 and Appl2

Invention 9: relating to the biomarker EEA1

Invention 10: relating to the biomarker Lamp-1

Invention 11: relating to the biomarkers MPR and M6PR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2014/000612

Supplemental Box

Invention 12: relating to the biomarker PAP

Invention 13: relating to the biomarker Actin

Invention 14: relating to the biomarker IGFR2

Invention 15: relating to the biomarker Myo1B

Invention 16: relating to the biomarker PDCD6IP

Invention 17: relating to the biomarker SDCBP

Invention 18: relating to the biomarker SDC1

Invention 19: relating to the biomarkers STX7 and STX12

Invention 20: relating to the biomarkers FGF1, FGF2, FGF3, FGFR1, FGFR2, FGFR3

Invention 21: relating to the biomarkers NOX2 and NOX4

Invention 22: relating to the biomarker Acid Ceramidase

Despite the lack of unity, all inventions have been searched.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI		テーマコード（参考）
	C07K	16/18	
	C12Q	1/68	A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100126000
弁理士 岩池 満
(72)発明者 ブルックス ドウグ
オーストラリア国 南オーストラリア州 ５０１４ チェルトナム ストラウド ストリート ノース ８０
(72)発明者 パーキンソン－ローレンス エマ
オーストラリア国 南オーストラリア州 ５０４３ モーフェットビル カーク アベニュー １０
(72)発明者 ジョンソン イアン
オーストラリア国 南オーストラリア州 ５２４４ ウッドサイド バーンズ ロード ４２０
(72)発明者 バトラー リサ
オーストラリア国 南オーストラリア州 ５０７５ パラダイス チャーチ ロード ４１
(72)発明者 ウェイガート ロベルト
アメリカ合衆国 ディストリクト オブ コロンビア ２０００８ ワシントン ３５番 ストリート ノースウエスト ４４１０

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 CB01 DA14 DA36 FB02 FB03 JA01
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QX01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA18 BA19 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	检测前列腺癌的方法		
公开(公告)号	JP2016527483A	公开(公告)日	2016-09-08
申请号	JP2016518800	申请日	2014-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	南澳大学		
申请(专利权)人(译)	南澳大利亚大学		
[标]发明人	ブルックスドウグ パーキンソンローレンスエマ ジョンソンイアン バトラーリサ ウェイガートロベルト		
发明人	ブルックス ドウグ パーキンソン-ローレンス エマ ジョンソン イアン バトラー リサ ウェイガート ロベルト		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/50 C07K16/18 C12Q1/68		
CPC分类号	C07K16/3069 C07K2317/34 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57434 G01N2800/54 A61N5/10 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 G01N2333/4703 G01N2333/82 G01N2333/96455		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/574.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/50.Z C07K16/18 C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	Seihayashi正幸 和义林		
优先权	2013902141 2013-06-13 AU		
其他公开文献	JP6696896B2 JP2016527483A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及检测前列腺癌的方法。本公开的某些实施方案提供了检测受试者中的前列腺癌的方法，包括从受试者检测选自内体相关标志物和/或溶酶体相关标志物的标志物。 【选择图】无

蛍光団		最大励起(λ)	最大発光(λ)	検出スペクトル (nm)
DAPI		358	461	407 – 471
ファロイジン Alexa Fluor（登録商標）488		495	518	500– 560
Alexa Fluor（登録商標） 488		495	519	500 – 550
Zenon（登録商標） 488		495	519	500 – 550
LysoTracker （登録商標）Green DND-26		504	511	505 – 560
LysoTracker（登録商標） Red DND-99		577	590	590 – 700
Zenon（登録商標） 568		578	603	570 – 630
Cy3		550	570	570 – 630
Alexa Fluor（登録商標） 633		632	647	650 – 730
トランスフェリン Alexa Fluor（登録商標） 633		632	647	650 – 730